

Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos
Especialização em Biologia e Ecologia Marinha

Monitorização de Estrogénios na Água do Estuário do Rio Douro por SPE-ELISA

Sílvia Eduarda Macedo Coelho

M

2016



Sílvia Eduarda Macedo Coelho

Monitorização de Estrogénios na Água do Estuário do Rio Douro por SPE-ELISA

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar – Recursos Marinhos submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientadora – Doutora Maria João Rocha

Categoria - Professora Auxiliar

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Coorientadora – Doutora Tânia Vieira Madureira

Categoria – Professora Auxiliar Convidada e Bolseira Post-Doc

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto

Agradecimentos

Rápido passou o tempo desde que neste mestrado entrei. Desde o início que tive a certeza absoluta que era uma escolha acertada e hoje, olhando para trás, ainda mais certeza tenho.

Claro que o meu sucesso nesta jornada não seria possível sem a ajuda de quem sempre me apoiou e acreditou que eu iria conseguir concluir esta etapa da minha vida académica, por isso a todos devo um sincero agradecimento.

Em primeiro quero agradecer à minha mãe. Ela incentivou-me a continuar quando eu queria desistir, acreditou em mim quando eu mesma deixei de acreditar. Posso dizer que tenho a maior sorte do mundo por tê-la como mãe, por tudo o que sempre fez para eu ser feliz e ter o maior sucesso na minha vida. Obrigada Mé por tudo e sabes que te adoro. À minha irmã, que mesmo estando longe, nunca deixou de me ajudar e apoiar. Philipon muitas vezes te fiz a vida num “inferno” mas sabes que é obrigação dos manos mais velhos aturar os mais novos e sabes que não vivo sem ti.

Família é quem nós escolhemos. Às vezes eles têm duas perninhas outras vezes têm quatro patinhas. É o caso dos “manos” que têm quatro patinhas. Também vos agradeço pelo apoio, que à vossa maneira, me têm dado há mais de 10 anos. A companhia fiel nos passeios, nas tardes enquanto eu tentei lidar com a tese e por todas as alegrias que me têm dado.

Amizades de infância muitas vezes se perdem mas eu tenho a sorte de até hoje as manter. Obrigada por todas as risadas, saídas à noite, tardes de disparates e brincadeiras e por todos os momentos, bons ou maus, que sempre me acompanharam e apoiaram. Lila, Carla, e Caló obrigada por esta amizade que dura já faz anos, meus irmãos de coração.

Quando no ICBAS entrei perdida me senti acompanhada de uma vontade gigante de me ir embora. Mas tive a sorte de conhecer pessoas fantásticas. Lia já falamos sobre isto e chegamos à conclusão que estávamos destinadas a conhecer-nos. Entramos noutra faculdade no mesmo ano e aulas juntas tivemos. Tu “abandonaste-

me” e vieste para o ICBAS. Quatro anos depois eu aqui apareci para nunca mais te livrares de mim. Nestes dois anos partilhamos imensos momentos, experiências, confidências e até uma tatuagem. Demos conta que muito temos em comum e quanto mais nos conhecemos mais tenho a certeza disso. És a minha irmã de coração mais nova e para toda a vida vais sê-lo. Obrigada pela tua amizade e por estares sempre pronta para me apoiares. Como sempre dissemos nós vamos acabar isto em grande! Normalmente dizemos com outras palavras mas não interessa. Sabes que mais te tenho a dizer mas não me deixam escrever mais!

Epeli adorei conhecer-te, és um miúdo espetacular. Durante este trabalho foste tu que me ajudaste a fazer as recolhas de água no Douro. Nunca te recusaste a acordar em dias de inverno às 7 da manhã, quando estarem 5°C nós já achávamos que estava calor. Obrigada por isso e pela nossa amizade que, mesmo havendo milhas de distância entre nós, nunca se vai perder.

Pedro também no mestrado te conheci e ao início foi difícil perceber-te. Conheci-te melhor e hoje, apesar de às vezes te querer matar, gosto imenso de ti. Obrigada pelo apoio e força que me tens dado e por acreditares em mim.

E no meio deste mestrado conheci um mouro e uma moura. Mouro horrível porque está sempre em Lisboa e já não quer saber das pessoas do Norte. Momentos fantásticos passamos e essas recordações guardo-as com imenso carinho. Acho que vou ganhar raízes à espera que voltes cá ao Porto Zé Pedro!! Diana, minha moura, tu ainda te aguentaste cá mais tempo, mas ainda assim não resististe e voltaste para Lisboa. És uma miúda espetacular e tenho imensas saudades tuas. Vê se vens cá ao Porto e trazes o nosso mouro na mala!!

Miguel resolveste ir lá para o Japão e abandonar-nos. Mas sabes que quando voltares não vais escapar e vais ter de me aturar outra vez. Obrigada pelo miúdo excelente que sempre foste para mim.

Sem querer pessoas vão entrando na nossa vida e especiais se vão tornando. Foi o teu caso Ivan!! Há pouco tempo convivemos, mas muito tens aturado, admira-me ainda não teres fugido!! Tens sido um apoio enorme e uma surpresa gigante e excelente.

Professores excelentes encontrei aqui no ICBAS. Por isso em particular quero agradecer à professora Maria João Rocha por toda a ajuda, apoio, incentivo e força que neste último ano me tem dado e pela paciência que comigo tem tido. À professora Tânia Madureira por me ter ajudado e por me ter transmitido novos conhecimentos. Claro que tenho de agradecer ao professor Eduardo Rocha que desde o início me acolheu e me fez sentir bem e feliz neste mestrado e agora me continua a dar apoio e força para que eu me mantenha sempre positiva. Quero também agradecer ao professor José Fernando Gonçalves pelo excelente professor que foi e pelos conhecimentos que me transmitiu. No laboratório que estive conheci pessoas fantásticas, as quais lhes quero agradecer. Obrigada Fernanda e Célia pelo apoio, e suporte e boas energias que com vocês sempre trazem.

Também quero agradecer ao Pedro Eloi por toda a boa disposição, momentos que vou sempre recordar, conversas que só para nós tinham sentido algum. Pela nossa amizade obrigada.

Obrigada pessoas!

Sem suporte institucional este estudo não teria sido possível, pelo que se agradece o apoio financeiro do ICBAS – U. PORTO, através do seu Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos. O estudo também beneficiou de fundos nacionais veiculados pela FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do projeto UID/Multi/04423/2013, e fundos Europeus para o Desenvolvimento Regional (FEDR), segundo o programa estrutural PT2020.



Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Este trabalho foi também implementado no âmbito do Programa Estruturado de I&D&I INNOVMAR - Inovação e Sustentabilidade na Gestão e Exploração de Recursos Marinhos (Referência NORTE-01-0145-FEDER-000035), nomeadamente no âmbito da Linha de Investigação ECOSERVICES, Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020), através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).



Resumo

O aumento da industrialização a nível mundial conduziu ao aparecimento de compostos poluentes no meio ambiente, nomeadamente compostos desreguladores endócrinos (DEs) estrogénicos que, à medida que aumentam a sua concentração ambiental, tornam-se uma ameaça para os ecossistemas. No entanto, devido a restrições definidas quer por legislação Europeia como nacional, tem-se vindo a observar na última década um decréscimo nas concentrações de DEs como a estrona (E1), 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) em águas superficiais portuguesas. Neste sentido, aplicou-se, com sucesso, a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com o objetivo de quantificar de forma simples e rápida níveis de concentrações muito baixas (ng/L) destes estrogénios em águas do estuário do Rio Douro.

Neste estudo foram selecionados três pontos de colheita (Fluvial, Freixo e Entre-os-Rios) e colhidas amostras em diferentes períodos do dia (manhã e noite) e em vários meses do ano (dezembro, janeiro, fevereiro e junho).

A escolha das áreas em análise baseou-se em estudos anteriores que apontavam o Fluvial e o Freixo como as zonas mais poluídas do estuário, e Entre-os-Rios como uma zona de referência. Deste modo, além das flutuações temporais pretendeu-se avaliar nestas áreas a possibilidade de existirem variações diurnas.

Os resultados obtidos revelaram não haver flutuações diárias, facto que contrasta com estudos anteriores na zona, e revelaram que atualmente as concentrações de E2 e EE2 são idênticas entre todos os locais estudados. A única hormona que apresenta valores mais baixos na zona de referência é a E1 o que revela a ação positiva desempenhada pelas ETARs (Estações de Tratamento de Águas Residuais) de Sobreiras e Freixo na qualidade das águas superficiais do estuário do Rio Douro. Deste modo, em média, as concentrações de E1, E2 e EE2 no Fluvial e Freixo foram respetivamente ≈ 7 ng/L, ≈ 1 ng/L e $\approx 0,1$ ng/L, e em Entre-os-Rios ≈ 2 ng/L, $\approx 0,6$ ng/L e $\approx 0,3$ ng/L. O facto das concentrações de E1 serem as mais altas, corrobora a hipótese de ocorrerem nas ETARs a degradação do E2 e EE2.

As concentrações mais elevadas de EE2 em junho sugerem que o aumento inesperado de habitantes na área metropolitana do Porto (turistas) tenha trazido consigo algumas restrições no que diz respeito à capacidade das ETARs tratarem eficazmente uma carga superior de esgotos urbanos.

Finalmente, a conversão das concentrações médias destes DEs em equivalentes de EE2 revelou que o impacto destes xenoestrogénios na zona em estudo implica uma exposição dos animais aquáticos, e indiretamente do Homem, a níveis capazes de induzirem desregulação endócrina nas zonas do Fluvial e Freixo.

Assim, conclui-se sobre a importância deste tipo de estudos como forma de monitorizar e avaliar os potenciais efeitos deletérios que estes DEs promovem nos ecossistemas.

Abstract

The increase of worldwide industrialization has led to the emergence of pollutants in the environment, including estrogenic endocrine disrupting compounds (EDs) which, as they increase in environmental concentration, become a threat to the ecosystems. However, due to constraints defined by both European and national legislations, a decrease in the concentrations of EDs such as oestrone (E1), 17 β -oestradiol (E2) and 17 α -ethynylestradiol (EE2) have been observed in the last decade in Portuguese surface waters. In this sense, the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) technique was successfully applied to this study with the aim of quantifying low concentrations (ng/L) of these oestrogens in surface waters of Douro River estuary.

In this study, were selected three sampling points (Fluvial, Freixo and Entre-os-Rios) and samples were taken at different times of the day (morning and night) and during several months of the year (December, January, February and June).

The choice of areas under analysis was based on previous studies that pointed Freixo and Fluvial as the most polluted areas of the estuary and Entre-os-Rios as a reference zone. Thus, in addition to temporal fluctuations, it was intended to evaluate in these areas the possibility of diurnal variations.

The results obtained showed no daily fluctuations, a fact that contrasts with previous studies in the area, and revealed that E2 and EE2 concentrations are currently the same among all studied sites. The only hormone that presents lower values in the reference zone is E1, which reveals the positive action performed by the WWTPs (Wastewater Treatment Plants) in the quality of the surface waters of the Douro River Estuary. Thus, on average, the concentrations of E1, E2 and EE2 in Fluvial and Freixo were respectively ≈ 7 ng/L, ≈ 1 ng/L e ≈ 0.1 ng/L, and in Entre-os-Rios ≈ 2 ng/L, ≈ 0.6 ng/L and ≈ 0.3 ng/L. The fact that the concentrations of E1 are the highest, corroborates the hypothesis that the degradation of E2 and EE2 occurs in the WWTPs.

The highest EE2 concentrations in June suggest that the unexpected increase in inhabitants in the Porto metropolitan area (tourists) has led to some restrictions on the capacity of the WWTPs to effectively handle a higher urban sewage load.

Finally, the conversion of the mean concentrations of these DEs to EE2 equivalents revealed that the impact of these xenoestrogens on the study area implies exposure of aquatic animals, and indirectly from humans, to levels capable of inducing endocrine disruption in Fluvial and Freixo areas.

Thus, it is concluded on the importance of this type of studies as a way to monitor and evaluate the potential deleterious effects that these DEs promote in ecosystems.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	v
Abstract	vii
Índice	ix
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
1. Introdução	1
1.1. Interferência dos DEs no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas	2
1.2. Exposição de peixes teleósteos a DEs estrogénicos	3
1.3. Exposição humana a DEs	4
1.4. DEs estrogénicos de origem natural e sintética	5
1.4.1. DEs estrogénicos de origem natural	6
1.4.2. DEs estrogénicos de origem sintética	9
1.5. Poluição aquática por DEs estrogénicos	10
1.6. Métodos químicos usados na monitorização de DEs	12
1.6.1. Extração de DEs em águas superficiais	12
1.6.2. Quantificação de DEs	13
1.7. Objetivos gerais do trabalho	13
2. Materiais e Métodos	15
2.1. Área e locais de colheita	15
2.2. Colheita das amostras	16
2.3. Preparação das amostras	18
2.4. Análise das amostras	18
2.5. Análise estatística dos dados	23
3. Resultados	25
4. Discussão	33
5. Conclusões	36
6. Referências bibliográficas	37

Índice de Figuras

Figura 1. Representação do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.	2
Figura 2. Estrutura química da E1.	7
Figura 3. Estrutura química do E2.	8
Figura 4. Estrutura química do EE2.	9
Figura 5. Localização dos locais de amostragem no estuário do Rio Douro.	16
Figura 6. Esquema de distribuição dos padrões e das amostras na microplaca para a determinação do E1 por ELISA.	20
Figura 7. Esquema de distribuição dos padrões e das amostras na microplaca para a determinação do E2 por ELISA.	21
Figura 8. Esquema de distribuição dos padrões e das amostras na microplaca para a determinação do EE2 por ELISA.	22
Figura 9. Protocolo utilizado nos ensaios ELISA para a quantificação da E1, E2 e EE2 em amostras de água do estuário do Rio Douro.	22
Figura 10. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes períodos de amostragem (manhã e noite).	26
Figura 11. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes locais de colheita.	26
Figura 12. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes meses de colheita.	27
Figura 13. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes locais e meses de colheita.	27
Figura 14. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes períodos de amostragem (manhã e noite).	28
Figura 15. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes locais de colheita.	28
Figura 16. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes meses de colheita.	29
Figura 17. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes locais e meses de colheita.	29
Figura 18. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes períodos de amostragem (manhã e noite).	30
Figura 19. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes locais de colheita.	30
Figura 20. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes meses de colheita.	31
Figura 21. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes locais e meses de colheita.	31

Índice de Tabelas

Tabela 1. Dados relativos à hora e altura de marés nos dias de amostragem.	17
Tabela 2. Valores de temperatura e pH nas águas recolhidas no estuário do Rio Douro.	25
Tabela 3. Potência relativa expressa em equivalentes (Eq) de EE2 (ng/L) para cada uma das hormonas.	32

1. Introdução

O aumento da industrialização mundial levou ao aparecimento de compostos poluentes no meio ambiente que, à medida que aumentam a sua concentração, tornam-se uma ameaça para os ecossistemas aquáticos e terrestres ¹. Diariamente são reportados novos compostos químicos considerados perigosos no *Chemical Abstracts Service* (CAS) ². Alguns destes compostos são capazes de perturbar a síntese, secreção, transporte, ligação, ação e eliminação de hormonas. Assim, nos organismos expostos, parâmetros como desenvolvimento, reprodução, homeostasia e comportamento podem sofrer alterações ^{3,4}. De acordo com a definição providenciada pela comissão *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee* (EDSTAC), estes compostos foram designados por Desreguladores Endócrinos (DEs) ⁵.

De facto, desde a Segunda Guerra Mundial que os DEs têm vindo a ser introduzidos no meio ambiente ⁶. No entanto, somente no início da década de 90 é que estes compostos começaram a ser considerados um problema quando foram notadas anomalias reprodutivas em peixes de água doce e também hermafroditismo em peixes que habitavam perto de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) ^{7,8}. Nessa mesma década, em 1996, o livro *Our Stolen Future* tornou público o problema da contaminação ambiental por DEs ⁹. Nesse mesmo ano foi requerido à *Environmental Protection Agency* (EPA) um programa para controlar a libertação destes compostos para o ambiente. Neste sentido, pouco tempo depois surgiu uma comissão para este efeito, a EDSTAC ⁵.

Quer em espécies marinhas, quer terrestres e até em humanos estão documentados os efeitos de DEs a nível reprodutivo, sabendo-se que quando o sistema hormonal é afetado por estes compostos, a reprodução pode mesmo cessar ¹⁰. Estes compostos têm a capacidade de se bioacumular, sendo esta visível, por exemplo, quando aves e mamíferos marinhos ao se alimentarem de peixe contaminado, apresentam no seu organismo concentrações de DEs iguais ou superiores às encontradas nos animais que lhes serviram de alimento ¹.

1.1. Interferência dos DEs no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas

Como o seu próprio nome indica, os DEs interferem com o sistema endócrino atuando, nos organismos afetados, ao nível do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, desregulando a libertação quer de neurohormonas quer de hormonas para a corrente sanguínea ¹¹.

Como se pode observar na figura 1, em condições normais são estímulos externos ao organismo que originam a libertação de neurotransmissores que, por sua vez induzem o hipotálamo a libertar neurohormonas e/ou neurotransmissores ao nível da hipófise. Esta glândula, além de outras hormonas, liberta gonadotrofinas, designadas por hormona luteinizante (LH) e hormona folículo estimulante (FSH), que induzem a síntese e libertação de hormonas esteroides sexuais (ex. 17β -estradiol - E2) em vertebrados. Estas, deslocando-se na corrente sanguínea, atingem as células e tecidos alvo, onde se ligam a recetores hormonais específicos ativando diferentes funções.

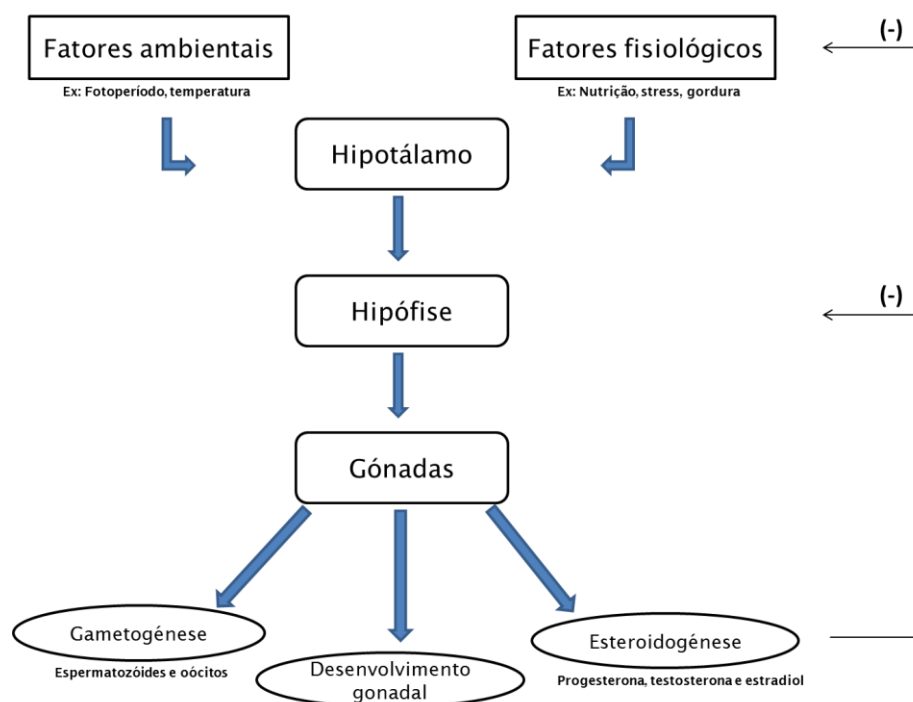


Figura 1. Representação do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (baseado em www.mcguido.com.br/eixo_hhg.htm).

As hormonas, mensageiras do sistema endócrino, dependendo da sua estrutura química são transportadas no sangue na sua forma livre ou acopladas a proteínas.

No caso das hormonas sexuais, quando a sua concentração atinge um valor máximo, estas inibem a libertação de FSH e/ou LH por mecanismos de retroalimentação negativa (figura 1) controlando assim a secreção e síntese de hormonas esteroídes ^{12, 13}.

Assim, a entrada de DEs provenientes do meio externo ao organismo vai desregular esse equilíbrio. Em peixes, o facto de os DEs interferirem com o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas pode levar a anomalias na diferenciação sexual. Estudos diversos mostram que animais que vivem em águas poluídas por DEs apresentam diversos distúrbios sexuais como hermafroditismo, *ovotestis*, feminização, entre outros ¹⁴⁻¹⁷.

Os mecanismos de ação dos DEs são variados podendo, de acordo com a sua natureza, estimularem (agonistas) ou inibirem (antagonistas) os mecanismos de transcrição e pós-transcrição, ou serem capazes de interferir com os canais de iões ou de proteínas responsáveis pela passagem de substratos nas células ¹⁰. No caso de os DEs interferirem com a síntese de neurotransmissores, sendo estes cruciais no desenvolvimento e manutenção cerebral e neural de um organismo, pode observar-se consequências muito graves ao nível cognitivo, de aprendizagem e de memória. Por exemplo, o transporte de dopamina é influenciado por alguns xenoestrogénios, podendo assim pensar-se numa relação entre o aumento de patologias e a presença de DEs no ambiente ¹⁸.

1.2. Exposição de peixes teleósteos a DEs estrogénicos

Os DEs estrogénicos induzem a produção de vitelogenina (VTG), glicolipofosfoproteína que funciona como precursor do vitelo presente na gema do ovo e que serve de nutriente ao embrião ¹⁹. Portanto, a VTG é produzida pelas fêmeas de peixes, anfíbios e répteis no fígado, e de seguida transportada para os ovários, onde é incorporada nos ovócitos. Como a síntese da VTG é controlada estrogénicamente, a sua presença em concentrações elevadas é anormal em machos indicando que estes animais estão expostos a DEs estrogénicos sendo por isto a VTG um biomarcador de exposição estrogénica ²⁰.

A título de exemplo, estudos em peixe-zebra (*Danio rerio*) mostraram que a exposição de embriões a DEs induzia a apoptose celular, resultando assim numa baixa eclosão e sobrevivência das larvas ²¹⁻²⁴.

A nível ambiental, em Portugal, foram notadas anomalias em peixes habitantes de áreas poluídas, como o aparecimento de *ovotestis*. Em Espanha no Rio Anoia, 43% dos machos de carpa (*Cyprinus carpio*) capturados também apresentaram *ovotestis* e atrofia testicular ²⁵. Na Florida, peixes-mosquito fêmeas (*Gambusia affinis*) capturados no Rio Fenhalloway, perto do local de descarga de efluentes industriais, possuíam características secundárias e alguns comportamentos sexuais masculinos ²⁶.

Portanto, além dos DEs com efeitos estrogénicos serem responsáveis pela diminuição da produção e qualidade dos ovos e esperma, feminização dos machos e mudanças de comportamento sexual ²⁷, estes foram ainda apontados como causadores de danos no ADN que podem ser acompanhados de diferenciação maligna das células, i.e. carcinogénese ²⁸.

1.3. Exposição humana a DEs

No caso do Homem, a maior via de exposição aos DEs é a ingestão de água e alimentos contaminados ¹. Como os DEs, em geral, têm baixa solubilidade em água e são lipossolúveis, acumulam-se no tecido adiposo de onde vão sendo libertados lentamente ²⁹.

As consequências da exposição a este tipo de compostos em fases cruciais do desenvolvimento humano podem ser graves, originando danos temporários ou permanentes ³⁰. Assim, a presença de DEs androgénicos durante a gestação poderão induzir, na puberdade, o aparecimento do Síndrome de Ovário Poliquístico (SOP) ³¹. Por outro lado, a exposição a DEs estrogénicos está associada ao desenvolvimento precoce da glândula mamária e a um possível aumento da secreção da Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH) ¹¹.

O aumento do número de casos de cancro da mama também tem sido associado com o incremento de DEs estrogénios, capazes de interferirem com a proliferação celular, aumentando o crescimento dos canais e alvéolos da glândula mamária ³².

³³. Além disto, estes compostos que incluem além de hormonas esteroides também ftalatos e bifenilos policlorados (PCBs - *polychlorinated biphenyls*), têm ainda sido associados com o desenvolvimento de patologias como oligospermia, diminuição de fertilidade ³⁴⁻³⁶, alterações da genitália, como criptorquidia e hipospadias ³⁷.

Ao nível da próstata também os efeitos de DEs são notados tendo sido observado uma relação entre a acumulação de PCBs no tecido adiposo e o aparecimento de cancro neste órgão. Também se registou nas últimas décadas uma diminuição da qualidade do esperma, facto que parece relacionar estas anomalias com a exposição estrogénica ainda *in utero* ³⁸.

Resultados de experimentação animal mostraram uma ligação entre a exposição fetal a estes compostos e anomalias prostáticas em fase adulta ¹¹.

1.4. DEs estrogénicos de origem natural e sintética

Foi na primeira metade do século XX que foram caracterizadas as primeiras hormonas humanas, a cortisona e a tiroxina ³⁹. Posteriormente foi identificada por Adolf Butenandt e Edward Adelbert Doisy a estrutura química de um estrogénio ⁴⁰.

Tendo um papel importante na regulação dos organismos, as hormonas esteroides dividem-se conforme o número de átomos de carbono na sua cadeia.

Progestogénios, glucocorticoides e mineralocorticoides são derivados do pregnano e apresentam 21 átomos de carbono. Os androgénios são esteroides que possuem 19 átomos de carbono e derivam do androstano. Os estrogénios, têm 18 átomos de carbono na sua cadeia e derivam da estrona (E1). Apesar das suas diferenças têm em comum o seu precursor que é o colesterol.

Assim, progestogénios, androgénios e estrogénios são hormonas esteroides sexuais e produzidas, respetivamente, no corpo lúteo (mamíferos) ou na teca e granulosa (peixes), testículos e ovários. A sua biossíntese é catalisada por enzimas. A maioria destas hormonas é transportada na corrente sanguínea pela globulina SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*). Como poucos são os esteroides que circulam livremente no sangue, a existência em circulação de compostos químicos que com-

petem com esteroides endógenos pelos locais de ligação das proteínas de transporte, pode levar a um aumento de hormonas livres o que acarreta respostas inadequadas ¹².

No organismo, o fígado é a principal fonte de proteínas como a, já referida, SHBG e a CBG (*Corticosteroid-Binding Globulin*) expressando-se estas em vários tecidos. A proteína SHBG liga-se aos recetores celulares para os quais tem afinidade iniciando-se assim uma cascata de estímulos. Em peixes já foi visto que este processo biológico pode ser destabilizado por ação de DEs ⁴¹.

Devido à presença de recetores intracelulares e membranares, as hormonas esteroides podem exercer as suas funções nas células alvo. O complexo esteroide/DE-recetor, uma vez atingindo o núcleo das células induz a transcrição do ADN em mRNA seguindo-se a posterior tradução/síntese proteica ⁴².

Os DEs podem ser classificados, tendo em conta a sua origem, sendo naturais ou sintéticos ¹³. De entre os DEs estrogénicos mais ativos destacam-se as hormonas naturais, a E1 e o E2, e a hormona sintética o etinilestradiol (EE2) ⁴³⁻⁴⁶.

1.4.1. DEs estrogénicos de origem natural

1.4.1.1. Estrona (E1)

De acordo com a designação definida pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), a E1 (figura 2) é quimicamente designada por 3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trieno-17-ona. É um composto hidrofóbico e com uma solubilidade em água aproximada de 30 mg/L. Como o seu coeficiente octanol-água (K_{ow}), expresso em $\log K_{ow}$ é de 3,43, no meio aquático, este estrogénio tem bastante afinidade para se adsorver tanto a partículas em suspensão como a sedimentos. Tendo como base a sua estrutura e as suas características moleculares, E1 apresenta um valor de $pK_a \approx 10$ ^{47, 48}.

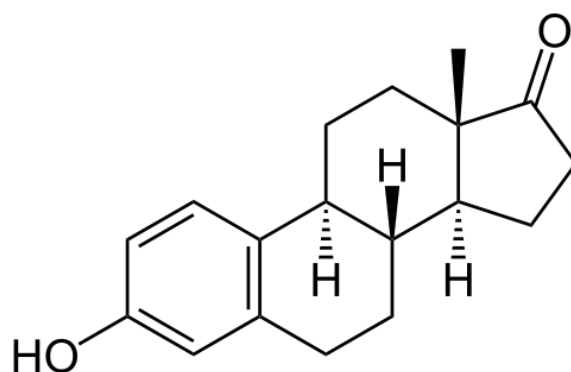


Figura 2. Estrutura química da E1 (www.sigmaaldrich.com, acesso em 03.11.16).

Como a E1 é um esteroide natural tem como função regular a reprodução e é responsável pelos caracteres sexuais secundários femininos ¹². Após a sua síntese a E1 é excretada tanto nas fezes como na urina, acabando assim por atingir o meio aquática via esgotos ou efluentes de ETARs. Como a E1 é ainda um produto de degradação do E2 [81], geralmente ocorre neste habitat em concentrações frequentemente mais altas do que as de E2 [84].

Por exemplo, observou-se que no Rio Tama (Japão), a E1 é a hormona que mais contribui para a sua atividade estrogénica destas águas, onde atinge concentrações entre 17,1 e 47,6 ng/L ^{49, 50}. Embora a potência estrogénica da E1 seja relativamente à do E2, cerca de cinco vezes menor, esta hormona ainda assim promove a diminuição do crescimento testicular em indivíduos expostos a estas águas devido à sua elevada concentração ambiental ^{51, 52}.

1.4.1.2. 17 β -Estradiol (E2)

O E2 (figura 3), é quimicamente designada pela IUPAC como estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol ⁵³. O E2 é um composto hidrofóbico que apresenta uma solubilidade em água de aproximadamente 5 mg/L. Como o seu log K_{ow} é de 4,01, este estrogénio tem bastante afinidade para se adsorver tanto às partículas em suspensão como a sedimentos. O E2 apresenta um valor de pKa de 10,4 ⁴⁸.

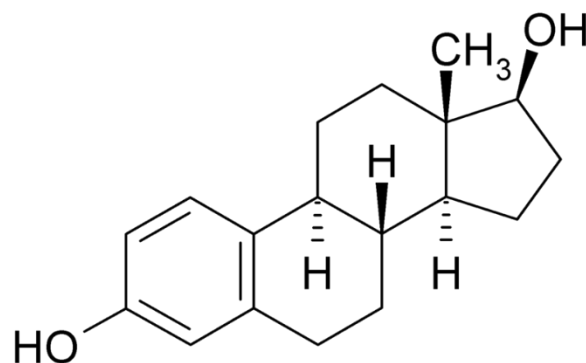


Figura 3. Estrutura química do E2 (www.sigmaaldrich.com, acesso em 03.11.16).

O E2 é uma hormona esteroide extremamente importante para a manutenção e desenvolvimento dos tecidos ósseos e reprodutivos, bem como para a manutenção dos caracteres sexuais femininos ⁵³. Nos machos, apesar dos níveis de E2 serem inferiores aos das fêmeas, esta hormona é também importante pois além de ser a precursora da testosterona é fundamental para a manutenção das células germinativas ⁵⁴.

Em peixes, além das funções acima descritas, e que são comuns em todos os vertebrados, o E2 induz ainda a síntese da VTG no fígado ¹⁹.

Como a partir de 1970 surgiram anticoncepcionais orais contendo E2 a sua presença no ambiente começou a aumentar visto que o E2 é eliminado pela urina e fezes ⁵⁵, ⁵⁶. Recentemente, o E2 ainda faz parte da composição de alguns contraceptivos orais combinados (COCs) ⁵⁷.

Assim, estudos realizados em machos de medaka (*Oryzias latipes*) mostraram que a exposição precoce a E2 induz mudanças de sexo, alteração do comportamento e ainda o desenvolvimento de *ovotestis* ⁵⁸.

1.4.2. DEs estrogénicos de origem sintética

1.4.2.1. 17 α -Etinilestradiol (EE2)

O EE2 (figura 4), é quimicamente denominado pela IUPAC como 17 α -etinil-1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol. O EE2 é um derivado do E2 que, devido ao grupo etinilo que tem na posição 17 da sua cadeia carbonada ⁵⁹⁻⁶¹, apresenta a característica de ser menos biodegradável. Para além disto, o EE2 é um composto hidrofóbico, com uma solubilidade em água de ≈ 3 mg/L. Como o seu log K_{ow} é de 3,67, tal como E1 e E2, apresenta afinidade para se adsorver tanto a partículas em suspensão como a sedimentos. O EE2 apresenta um valor de pKa de 10,4 ⁴⁸.

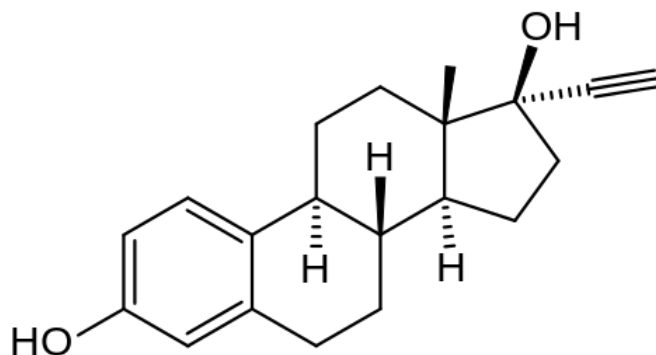


Figura 4. Estrutura química do EE2 (www.sigmaaldrich.com, acesso em 03-11-2016).

Fazendo parte da maioria dos COCs, o EE2 tornou-se uma das hormonas mais abundantes em efluentes de ETARs ⁶². Em 2011, a Organização das Nações Unidas (ONU) revelou que em 2009, 8,8% das mulheres em todo o mundo usa COCs como método anticoncecional, ou seja, mais de 100 milhões de mulheres ⁶³.

Para além do seu uso a nível contraceptivo, o EE2 também faz parte da composição de medicamentos com outros fins, tais como o tratamento da síndrome da menopausa e pós-menopausa, terapia de reposição fisiológica, osteoporose, cancro da mama e da próstata ^{64, 65}.

Uma vez que a eliminação corporal do EE2 é feita via urina e fezes, os efluentes das ETARs são, tal como para outros DEs, uma porta de entrada deste esteroide no meio ambiente ⁴³. Estudos revelam que os tratamentos realizados nas ETARs são insuficientes para a remoção do EE2 das águas residuais ²⁷. Fatores como época do

ano, tipo de tratamento e nível de urbanização influenciam a quantidade desta hormona nos efluentes das ETARs ^{66, 67}. Uma vez no ambiente, principalmente no meio aquático, esta hormona encontra-se em concentrações biologicamente ativas ⁶⁸.

O EE2 tornou-se o substituto do mestranol nos COCs fazendo parte da maioria destes contraceptivos. Inicialmente, as dosagens de EE2 nos COCs eram mais altas do que atualmente ⁵⁷. Após absorção o EE2 é metabolizado lentamente no fígado ⁵⁷, permitindo maior retenção nos tecidos e provocando consequentemente efeitos hepáticos potencialmente deletérios.

No entanto, o seu uso não é exclusivamente humano. Na indústria pecuária este esteroide sintético é usado para tratar e prevenir distúrbios reprodutivos e também estimular o crescimento melhorando a produção. Em aquacultura é usado para desenvolver populações com um só sexo ⁶⁹. Assim, embora a urina humana seja a principal fonte deste estrogénio ⁷⁰ também a indústria pecuária, é igualmente uma potencial fonte deste composto.

1.5. Poluição aquática por DEs estrogénicos

Os DEs têm sido observados e quantificados em todos os ambientes aquáticos ⁹. Como os DEs acarretam consigo problemas de saúde ambiental o tratamento dos esgotos em ETARs é fundamental.

No entanto, nem sempre as ETARs são eficientes pois fatores como $\log K_{ow}$ e a solubilidade destes compostos muitas vezes tornam difíceis a sua eliminação ^{9, 71, 72}. Neste sentido, foram testados alguns tratamentos como por exemplo os chamados processos oxidativos avançados (AOPs - *Advanced Oxidation Processes*). Estes procedimentos recorrem à utilização de ozono, cloro, peróxido de hidrogénio, raios ultravioleta (UV) e em alguns casos a combinação destes ⁷³. No entanto, estes procedimentos também apresentam desvantagens entre as quais se destacam a possibilidade da formação de subprodutos tóxicos e os custos associados aos AOPs ⁷⁴⁻⁷⁶.

Outra técnica também considerada apropriada para a remoção de DEs tem sido a adsorção com carbono ativado. Este procedimento mostrou-se vantajoso na remoção da maioria dos poluentes orgânicos (i.e. taxas superiores a 90%) devido às suas interações hidrofóbicas ^{1, 77}.

A ausência de regulamentação adequada no que respeita à presença destes compostos para o meio ambiente é também um fator preocupante. Recentemente, e através da aplicação desde 2000 da Diretiva-Quadro da Água (DQA) ⁷⁸ iniciaram-se uma série de iniciativas que visam, dentro da comunidade europeia a proteção da qualidade de todos os recursos hídricos europeus.

No entanto, esta iniciativa não foi seguida pela maior parte dos países não europeus, nomeadamente nos Estados Unidos da América (EUA), onde não há limite máximo de concentrações destes compostos nas águas.

Mundialmente, as concentrações mais altas de E1 e E2 foram quantificadas no Japão, Rio Tama (6,4 – 85,6 ng/L para E1 e 0,5 -12 ng/L para E2) ⁵⁰, em Taiwan, Rio Shui-Dan (22,4 – 66,2 ng/L para E1 e 1,4 – 33,9 ng/L para E2) ⁷⁹ e na China, Rio Pérola (\leq 78,7 ng/L para E1) ^{80, 81}. Relativamente ao EE2, os níveis mais altos deste estrogénio foram determinados em Espanha, Rio Ebro (30 – 130 ng/L) ⁸² e em Itália, Lagoa de Veneza (1,0 – 34 ng/L) ⁸³.

Como em Portugal as concentrações médias de E1, E2 e EE2 variam entre 6 ng/L e 10 ng/L⁸⁴, estas são passíveis de causar danos tanto em organismos aquáticos como em humanos ⁸⁵.

Por exemplo, no estuário do rio Lima as concentrações destas três hormonas variaram entre 0,3 e 36,3 ng/L, sendo este valor máximo atingido pela E1 ⁸⁶. No estuário do Rio Ave, em tempos considerado um dos mais poluídos da Europa, as concentrações destas hormonas variaram entre 0,3 e 20,4 ng/L, sendo o EE2 responsável pela maior carga estrogénica deste habitat ⁸⁷. No estuário do Rio Douro a poluição por DEs estrogénicos tem vindo a diminuir ao longo do tempo, no entanto, no passado foi considerado o segundo rio mais poluído do nosso país ⁸⁴, não só derivado da presença de estrogénios mas também de outros poluentes biologicamente ativos ^{88, 89}.

1.6. Métodos químicos usados na monitorização de DEs

1.6.1. Extração de DEs em águas superficiais

A preparação das amostras é um passo fulcral numa análise, garantindo a qualidade da amostra desde o correto armazenamento até à sua quantificação. Esta tem como objetivos principais o isolamento dos analitos num solvente apropriado para posterior análise, e a máxima remoção de interferentes da amostra. Em amostras de água, as concentrações de hormonas estrogénicas são regra geral baixas (ng/L), sendo assim necessária a pré-concentração dos analitos recorrendo a técnicas de extração ⁹⁰. Antes do processo de extração propriamente dito, acidificar as amostras pode tornar-se vantajoso pois previne a atividade microbiana, permitindo uma melhor preservação das mesmas ⁹¹⁻⁹³.

De entre algumas técnicas de extração usadas em águas superficiais, a extração em fase sólida (SPE - *Solid Phase Extraction*) tem sido amplamente empregue para o isolamento e concentração de diversos DEs ⁹⁴⁻⁹⁶.

A SPE foi introduzida no início da década de 70 com o objetivo de ultrapassar as desvantagens associadas a outro método usado até então, a extração líquido-líquido (LLE). A SPE tem vindo a ser atualizada ao longo dos tempos, destacando-se as novas configurações experimentais, novos tipos de fases sólidas e a automatização dos sistemas de extração. Assim, as vantagens desta técnica face à LLE são essencialmente a remoção de compostos interferentes, a pré-concentração das amostras e a maior estabilidade no armazenamento dos analitos ⁹⁷.

Os princípios básicos da SPE assentam na separação dos compostos entre duas fases, a sólida e a líquida, pretendendo-se que numa fase inicial do processo os analitos fiquem retidos na fase sólida até posterior eluição. Assim, de um modo geral, inicia-se o processo com a ativação do sorvente com um solvente adequado, seguindo-se a passagem da amostra pela fase sólida para a qual os analitos têm afinidade. Finalmente é feita a eluição dos analitos da fase sólida, recorrendo a um solvente para o qual estes tenham afinidade ⁹⁷.

1.6.2. Quantificação de DEs

Para a quantificação de DEs em amostras de água, existem várias técnicas analíticas que podem ser usadas, tal como por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*)⁹⁰, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS - *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)⁹⁸ e também métodos imuno-enzimáticos (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)⁹⁹.

Considerada uma técnica analítica não instrumental¹⁰⁰, o método de ELISA neste contexto da quantificação de DEs, tem como princípio básico a reação de ligação entre a hormona estrogénica em estudo e o anticorpo específico adsorvido à placa de ELISA¹⁰¹. Este tipo de metodologia tem vindo a ser utilizada em várias determinações de estrogénios em águas residuais, de rio e também água para consumo¹⁰²⁻¹⁰⁴. Comparativamente com outras técnicas, este ensaio tem algumas vantagens tais como o facto de ser rápido, de fácil manuseio e altamente sensível, podendo atingir-se limites de deteção na ordem dos pg/L. Permite ainda analisar várias amostras simultaneamente e o seu custo é relativamente acessível^{101, 102, 105-107}.

1.7. Objetivos gerais do trabalho

As hormonas estrogénicas E1, E2 e EE2 são, entre os diferentes tipos de DEs, aquelas que apresentam maior capacidade para destabilizar o sistema endócrino tanto de animais terrestres como aquáticos¹⁰⁸. Por este motivo a sua quantificação/monitorização ambiental é essencial sendo objetivos principais deste trabalho:

- Testar a aplicabilidade da técnica de ELISA em amostras de águas superficiais do estuário do Rio Douro;
- Determinar a evolução temporal das concentrações de E1, E2 e EE2 desde 2006 até 2016;
- Investigar a possibilidade de existirem variações diurnas nas concentrações dos estrogénios supracitados;

- Investigar a possibilidade de existirem variações temporais (dezembro, janeiro, fevereiro e junho) das concentrações dos estrogénios supracitados;
- Observar a possibilidade de existirem diferenças entre as concentrações de E1, E2 e EE2 em três zonas de colheita diferentes, i.e. Fluvial, Freixo e Entre-os-Rios;
- Retirar ilações sobre o modo de funcionamento das ETARs de Sobreiras e do Freixo e antever a possibilidade de haver, ou não, condições ambientais para a ocorrência de desregulação endócrina na área em estudo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área e locais de colheita

Para a quantificação da E1, E2 e EE2 foram realizadas recolhas de água do estuário do Rio Douro.

O Rio Douro nasce em Espanha na Serra de Urbião, e atravessa o norte de Portugal, desaguando no Oceano Atlântico junto à cidade Invicta do Porto. Com cerca de 900 km de extensão é o terceiro maior rio da Península Ibérica. No seu percurso estão incluídas extensas áreas de habitação, zonas industriais e agrícolas que em muito contribuem para a sua poluição e também para a degradação do seu estuário. Cerca de 18 000 km² da sua bacia hidrográfica é portuguesa representando aproximadamente 19% da sua área total.

Ao longo do leito do Rio Douro nota-se um desnível favorável ao aproveitamento hidroelétrico. Uma das barragens construída foi a de Crestuma, a mais perto do estuário, que permite uma acumulação de poluentes ¹⁰⁹.

Localizado entre as cidades do Porto e Vila Nova de Gaia, o estuário do Rio Douro tem cerca de 20 hectares de extensão, estendendo-se desde a Baía de São Paio e a zona arenosa do Cabedelo.

Na sua margem sul, na zona da Afurada, em dezembro de 2007 foi criada a Reserva Natural Local do Estuário do Douro, local onde se concentram uma enorme diversidade de espécies de aves.

Neste estudo foram selecionados três pontos de amostragem localizados na margem norte do estuário, os quais se designaram por Fluvial (41°08'52.8"N 8°39'12.2"W), Freixo (41°08'38.7"N 8°34'45.0"W) e Entre-os-Rios (41°08'21.3"N 8°34'21.9"W).

Esta escolha foi feita tendo em conta primeiramente a influência antropogénica a que estão sujeitos. O local Fluvial recebe diretamente as descargas da ETAR de Sobreiras. Nesta estação é feito tratamento primário, secundário e terciário (Figura

5A). O local do Freixo (Figura 5B) está sob influência das descargas realizadas pela ETAR do Freixo, sendo estas contínuas ao longo do dia e noite. Esta estação faz tratamento primário e secundário das águas residuais. O local Entre-os-Rios (Figura 5C) foi escolhido por ser considerado referência em relação aos outros locais, uma vez que está submetido a uma menor influência antropogénica. Adicionalmente foram tidos em consideração estudos anteriores onde foram já determinadas concentrações de E1, E2 e EE2 nos locais do Fluvial e Freixo superiores às quantificadas próximo ao local referência ^{110, 111}.

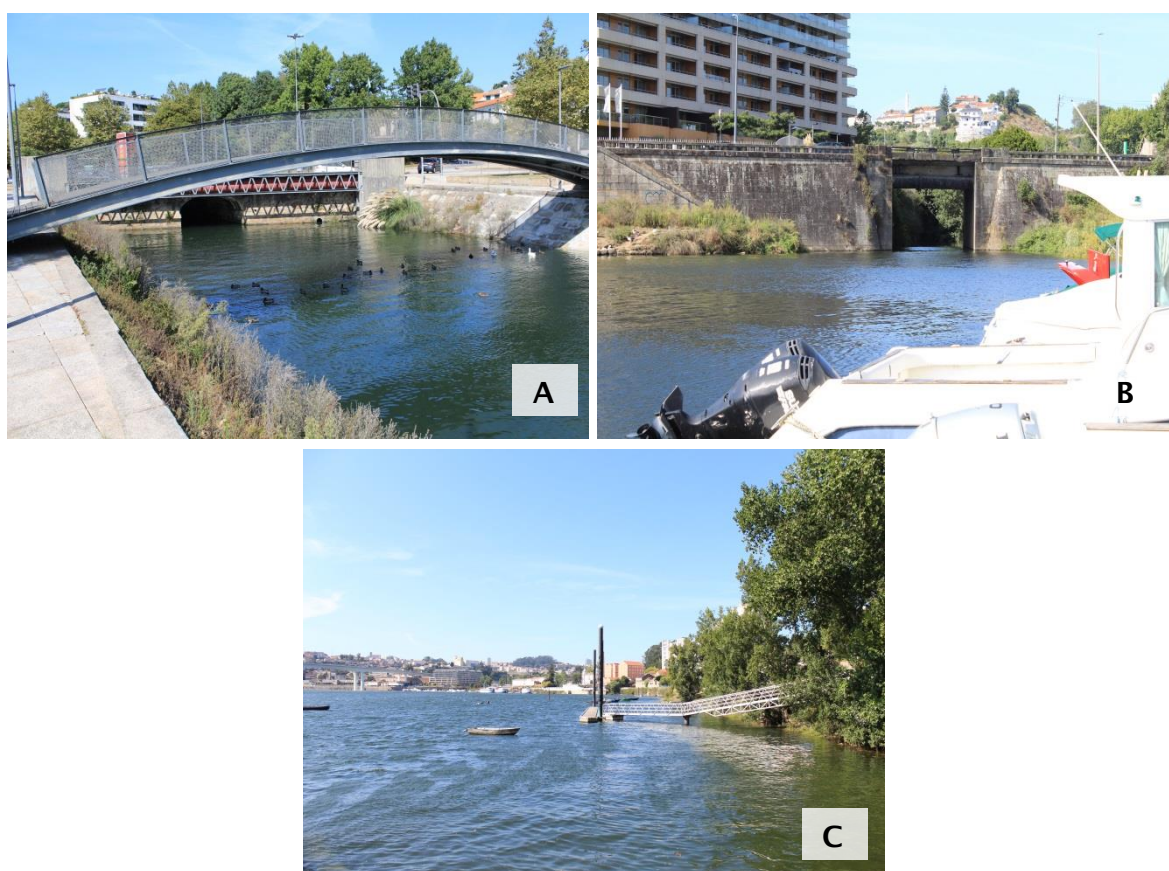


Figura 5. Localização dos locais de amostragem no estuário do Rio Douro. A- Fluvial, B- Freixo, C- Entre-os-Rios (*fotografias da autoria de Pedro Zirc*).

2.2. Colheita das amostras

As amostras de água estuarina foram recolhidas em quatro dias distintos entre dezembro de 2015 e junho de 2016, de manhã e à noite. As colheitas foram sempre realizadas em baixa-mar, garantindo o mínimo de variação entre a altura de marés, com base na informação disponibilizada pelo Instituto Português Hidrográfico ¹¹². As amostras foram recolhidas seguindo a ordem: Fluvial, Freixo e Entre-os-Rios. Os

detalhes relativos a cada dia de colheita estão descritos na tabela 1. Cada amostra de água (2 L) foi armazenada e transportada imediatamente para o laboratório em frascos de vidro âmbar, previamente lavados com água ultrapura e água do local, e mantidos a 4°C até ao processo de extração. As amostras da manhã foram acidificadas e extraídas logo à chegada ao laboratório, enquanto as da noite após acidificação foram mantidas igualmente a 4°C durante 12 horas e, posteriormente extraídas.

Tabela 1. Dados relativos à hora e altura de marés nos dias de amostragem.

Dia	Hora	Altura de maré (m)
10.12.2015	8h04 min	0,81
	20h18 min	0,76
21.01.2016	6h54 min	0,86
	19h12 min	0,86
20.02.2016	7h37 min	0,81
	19h07 min	0,85
7.06.2016	11h13 min	0,54
	23h48 min	0,47

2.3. Preparação das amostras

Após a chegada ao laboratório as amostras foram acidificadas a pH 2 (WTW pH530, D8120 Weilheim) com ácido sulfúrico (98%) da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). De seguida, procedeu-se à sua filtração, usando filtros de fibra de vidro (Millipore, Irlanda).

Até um máximo de 12 h pós-colheita, as amostras foram sujeitas a SPE usando um coletor certificado da Waters®. Os compostos (E1, E2 e EE2) foram extraídos com base num protocolo previamente otimizado ¹¹³. Resumidamente, os cartuchos OASIS®HLB (1000 mg) foram inicialmente condicionados com 25 mL de uma mistura (50:50, v/v) de metanol (MeOH) e diclorometano (DCM), ambos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), 12 mL de MeOH e 25 mL água ultrapura Milli-Q (condutividade = 0.054 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a 25°C) sob gravidade. Seguidamente, as amostras de água acidificada (2 L) foram passadas pelos cartuchos sob vácuo a um fluxo entre 5 e 7 mL/min. Os cartuchos foram lavados com 25 mL de água ultrapura e 1 mL de MeOH e secos sob vácuo durante 30 minutos. Dado que as águas do estuário possuem grande quantidade de matéria orgânica foram usados adicionalmente cartuchos de 1000 mg de sílica (Teknokroma, Barcelona, Espanha), previamente condicionados com 10 mL de MeOH:DCM (50:50, v/v). Para a eluição de ambos os cartuchos (Oasis® HLB e sílica), dispostos em série, utilizaram-se 20 mL de MeOH:DCM (50:50, v/v). No final, procedeu-se à evaporação dos solventes a uma temperatura entre 37 e 40 °C até à secura completa. Este extrato foi posteriormente reconstituído em 1 mL de metanol anidro (99,8%) da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

2.4. Análise das amostras

Para a quantificação do E1, E2 e EE2 utilizaram-se ensaios comerciais de ELISA, adaptados à análise de amostras de águas (ECOLOGIENA® 96 poços, Tokiwa Chemical Industries CO., LTD, lotes com referência TLK01E1, TLK01E2 e TCT01EE, respetivamente).

Segundo as recomendações do fabricante, as amostras a analisar devem estar dissolvidas em MeOH anidro 10%, pelo que 300 μL da amostra obtida previamente foram evaporados e reconstituídos neste solvente. Nos casos de amostras muito concentradas foi necessário proceder a diluições adicionais de forma a permitir a

quantificação dentro do intervalo das curvas de calibração (E1 – 0,05 a 5,00 µg/L, E2 – 0,05 a 1,00 µg/L, e EE2 – 0,05 a 3,00 µg/L).

De acordo com as especificações dos ensaios, o coeficiente de variação é inferior a 10% nos intervalos dinâmicos de cada hormona. Posto isto, para a quantificação do E2 e E1, nas amostras do Freixo e Entre-os-Rios a diluição foi de 1:10 e para as do Fluvial de 1:20. No caso do EE2 não foram necessárias diluições. Todas as amostras foram analisadas em duplicado. Nas figuras 6 a 8 estão exemplificados os esquemas de distribuição dos padrões e amostras nas respectivas placas de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Branco	Std 0,8	E.Rios-M 10.12.15 1:10	Fluvial-M 21.01.16 1:20	Freixo-T 21.01.16 1:10	E.Rios-M 20.02.16 1:10	Fluvial-M 7.06.16 1:20	Freixo-T 7.06.16 1:10
B	Branco	Std 0,8	E.Rios-M 10.12.15 1:10	Fluvial-M 21.01.16 1:20	Freixo-T 21.01.16 1:10	E.Rios-M 20.02.16 1:10	Fluvial-M 7.06.16 1:20	Freixo-T 7.06.16 1:10
C	Std 0	Std 5	Fluvial-T 10.12.15 1:20	Freixo-M 21.01.16 1:10	E.Rios-T 21.01.16 1:10	Fluvial-T 20.02.16 1:20	Freixo-M 7.06.16 1:10	E.Rios-T 7.06.16 1:10
D	Std 0	Std 5	Fluvial-T 10.12.15 1:20	Freixo-M 21.01.16 1:10	E.Rios-T 21.01.16 1:10	Fluvial-T 20.02.16 1:20	Freixo-M 7.06.16 1:10	E.Rios-T 7.06.16 1:10
E	Std 0,05	Fluvial-M 10.12.15 1:20	Freixo-T 10.12.15 1:10	E. Rios-M 21.01.16 1:10	Fluvial-M 20.02.16 1:20	Freixo-T 20.02.16 1:10	E.Rios-M 7.06.16 1:10	
F	Std 0,05	Fluvial-M 10.12.15 1:20	Freixo-T 10.12.15 1:10	E. Rios-M 21.01.16 1:10	Fluvial-M 20.02.16 1:20	Freixo-T 20.02.16 1:10	E.Rios-M 7.06.16 1:10	

(Continua)

(Continuação)

	1	2	3	4	5	6	7	8
G	Std 0,3	Freixo-M 10.12.15 1:20	E.Rios-T 10.12.15 1:10	Fluvial-T 21.01.16 1:20	Freixo-M 20.02.16 1:10	E.Rios-T 20.02.16 1:10	Fluvial-T 7.06.16 1:20	
H	Std 0,3	Freixo-M 10.12.15 1:20	E.Rios-T 10.12.15 1:10	Fluvial-T 21.01.16 1:20	Freixo-M 20.02.16 1:10	E.Rios-T 20.02.16 1:10	Fluvial-T 7.06.16 1:20	

Figura 6. Esquema de distribuição dos padrões (Std, de 0 a 5 µg/L) e das amostras (Fluvial, Freixo e Entre-os-Rios, M- manhã ou T- tarde, diluições 1:10 e 1:20) na microplaca para a determinação do E1 por ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Branco	Std 0,4	E.Rios-M 10.12.15 1:10	Fluvial-M 21.01.16 1:20	Freixo-T 21.01.16 1:10	E.Rios-M 20.02.16 1:10	Fluvial-M 7.06.16 1:20	Freixo-T 7.06.16 1:10
B	Branco	Std 0,4	E.Rios-M 10.12.15 1:10	Fluvial-M 21.01.16 1:20	Freixo-T 21.01.16 1:10	E.Rios-M 20.02.16 1:10	Fluvial-M 7.06.16 1:20	Freixo-T 7.06.16 1:10
C	Std 0	Std 1	Fluvial-T 10.12.15 1:20	Freixo-M 21.01.16 1:10	E.Rios-T 21.01.16 1:10	Fluvial-T 20.02.16 1:20	Freixo-M 7.06.16 1:10	E.Rios-T 7.06.16 1:10
D	Std 0	Std 1	Fluvial-T 10.12.15 1:20	Freixo-M 21.01.16 1:10	E.Rios-T 21.01.16 1:10	Fluvial-T 20.02.16 1:20	Freixo-M 7.06.16 1:10	E.Rios-T 7.06.16 1:10
E	Std 0,05	Fluvial-M 10.12.15 1:20	Freixo-T 10.12.15 1:10	E.Rios-M 21.01.16 1:10	Fluvial-M 20.02.16 1:20	Freixo-T 20.02.16 1:10	E.Rios-M 7.06.16 1:10	
F	Std 0,05	Fluvial-M 10.12.15 1:20	Freixo-T 10.12.15 1:10	E.Rios-M 21.01.16 1:10	Fluvial-M 20.02.16 1:20	Freixo-T 20.02.16 1:10	E.Rios-M 7.06.16 1:10	

(Continua)

(Continuação)

	1	2	3	4	5	6	7	8
G	Std 0,15	Freixo-M 10.12.15 1:10	E.Rios-T 10.12.15 1:10	Fluvial-T 21.01.16 1:20	Freixo-M 20.02.16 1:10	E.Rios-T 20.02.16 1:10	Fluvial-T 7.06.16 1:20	
H	Std 0,15	Freixo-M 10.12.15 1:10	E.Rios-T 10.12.15 1:10	Fluvial-T 21.01.16 1:20	Freixo-M 20.02.16 1:10	E.Rios-T 20.02.16 1:10	Fluvial-T 7.06.16 1:20	

Figura 7. Esquema de distribuição dos padrões (Std, de 0 a 1 µg/L) e das amostras (Fluvial, Freixo e Entre-os-Rios, M- manhã ou T- tarde, diluições 1:10 e 1:20) na microplaca para a determinação do E2 por ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Branco	Std 0,5	E.Rios-M 10.12.15	Fluvial-M 21.01.16	Freixo - T 21.01.16	E.Rios-M 20.02.16	Fluvial-M 07.06.16	Freixo-T 07.06.16
B	Branco	Std 0,5	E.Rios-M 10.12.15	Fluvial-M 21.01.16	Freixo - T 21.01.16	E.Rios-M 20.02.16	Fluvial-M 07.06.16	Freixo-T 07.06.16
C	St 0	Std 3	Fluvial - T 10.12.15	Freixo-M 21.01.16	E.Rios - T 21.01.16	Fluvial -T 20.02.16	Freixo-M 07.06.16	E.Rios-T 07.06.16
D	Std 0	Std 3	Fluvial - T 10.12.15	Freixo-M 21.01.16	E.Rios - T 21.01.16	Fluvial -T 20.02.16	Freixo-M 07.06.16	E.Rios-T 07.06.16
E	Std 0,05	Fluvial-M 10.12.15	Freixo - T 10.12.15	E.Rios-M 21.01.16	Fluvial-M 20.02.16	Freixo-T 20.02.16	E.Rios-M 07.06.16	
F	Std 0.05	Fluvial-M 10.12.15	Freixo - T 10.12.15	E.Rios-M 21.01.16	Fluvial-M 20.02.16	Freixo-T 20.02.16	E.Rios-M 07.06.16	

(Continua)

(Continuação)

	1	2	3	4	5	6	7	8
G	Std 0,15	Freixo-M 10.12.15	E.Rios-T 10.12.15	Fluvial-T 21.01.16	Freixo-M 20.02.16	E.Rios -T 20.02.16	Fluvial-T 07.06.16	
H	Std 0,15	Freixo-M 10.12.15	E.Rios-T 10.12.15	Fluvial-T 21.01.16	Freixo-M 20.02.16	E.Rios -T 20.02.16	Fluvial-T 07.06.16	

Figura 8. Esquema de distribuição dos padrões (Std, de 0 a 3 µg/L) e das amostras (Fluvial, Freixo e Entre-os-Rios, M- manhã ou T- tarde) na microplaca para a determinação do EE2 por ELISA.

De forma geral, o procedimento adotado em cada um dos ensaios de ELISA teve por base o mesmo protocolo, descrito resumidamente na figura 9.

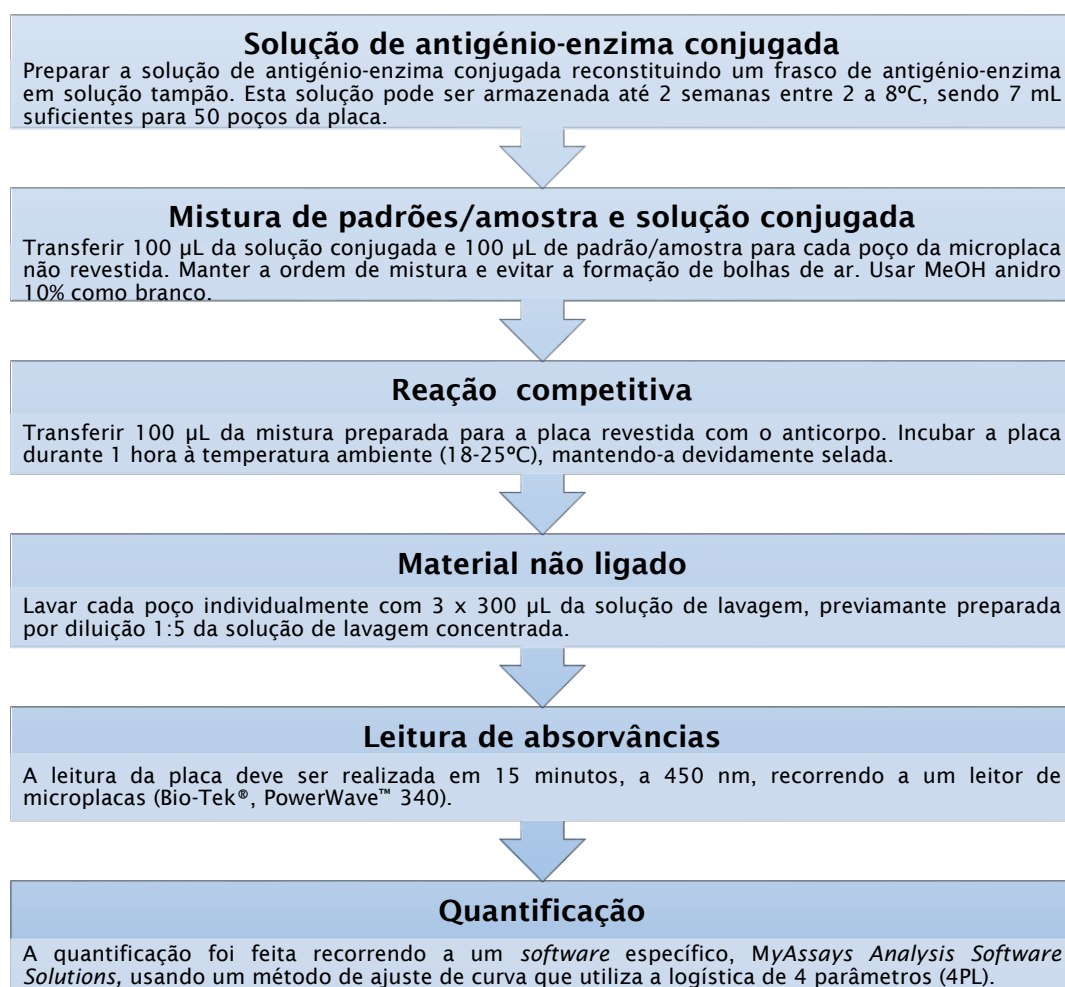


Figura 9. Protocolo utilizado nos ensaios ELISA para a quantificação da E1, E2 e EE2 em amostras de água do estuário do Rio Douro.

2.5. Análise estatística dos dados

Para a análise dos dados obtidos foi usado o *software Statistica* versão 13. Inicialmente testou-se a normalidade e homogeneidade de variâncias utilizando os testes *Shapiro-Wilk* e *Levene's*, respetivamente. O teste *one-way ANOVA* foi aplicado para verificar as diferenças das concentrações entre horas, meses e diferentes locais. Dado que não se verificaram diferenças entre os períodos de amostragem da manhã e noite, os dados foram agrupados para as posteriores análises. O teste *post-hoc Tukey* foi usado para as comparações múltiplas entre as médias das concentrações obtidas. As diferenças foram consideradas significativas para um valor de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

Os valores de temperatura e pH da água, nos vários locais de colheita em cada uma das amostragens, estão apresentados na tabela 2. Os valores de pH mantiveram-se estáveis entre 7,16 e 7,83. Em relação à temperatura, esta oscilou entre 12,0 (janeiro de 2016) e 15,3°C (junho de 2016).

Tabela 2. Valores de temperatura e pH nas águas recolhidas no Estuário do Rio Douro.

Dia	Hora	Local	pH	Temperatura (°C)
10.12.15	Manhã	Fluvial	7,50	15,0
		Freixo	7,48	14,5
		Entre-os-Rios	7,54	13,0
	Noite	Fluvial	7,26	15,1
		Freixo	7,16	14,8
		Entre-os-Rios	7,46	14,1
21.01.16	Manhã	Fluvial	7,45	12,0
		Freixo	7,51	13,2
		Entre-os-Rios	7,44	13,0
	Noite	Fluvial	7,56	12,2
		Freixo	7,5	14,3
		Entre-os-Rios	7,47	14,7
20.02.16	Manhã	Fluvial	7,83	15,0
		Freixo	7,39	14,5
		Entre-os-Rios	7,72	13,0
	Noite	Fluvial	7,74	14,1
		Freixo	7,41	14,2
		Entre-os-Rios	7,75	14,1
7.06.16	Manhã	Fluvial	7,60	14,7
		Freixo	7,46	14,2
		Entre-os-Rios	7,59	13,9
	Noite	Fluvial	7,58	15,3
		Freixo	7,27	15,0
		Entre-os-Rios	7,53	14,5

Considerando os valores médios das concentrações de hormonas estrogénicas analisadas nos três locais de amostragem e nos vários períodos de amostragem ao longo do estuário do Rio Douro, o composto com maior concentração foi E1 (5,7 ng/L), seguida de E2 (1,03 ng/L) e EE2 (0,18 ng/L). As concentrações mínimas e

máximas variaram entre 0,55 e 28,82 ng/L para E1, 0,25 e 3,65 ng/L para E2 e 0,03 e 0,78 ng/L para EE2. Ao longo do dia (manhã vs noite) a variação das concentrações de E1 não foi significativa ($p= 0,157$), tal como se pode comprovar pela análise da figura 10.

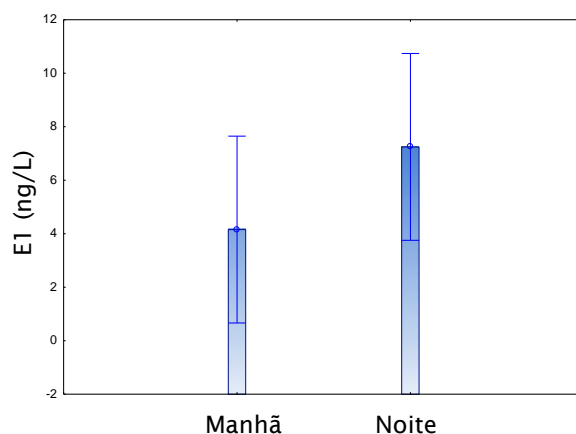


Figura 10. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes períodos de amostragem (manhã e noite). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada período do dia.

No caso de E1, as concentrações médias no ponto Entre-os-Rios foram significativamente mais baixas do que as obtidas no ponto de colheita do Freixo ($p= 0,017$) e Fluvial ($p= 0,006$), figura 11.

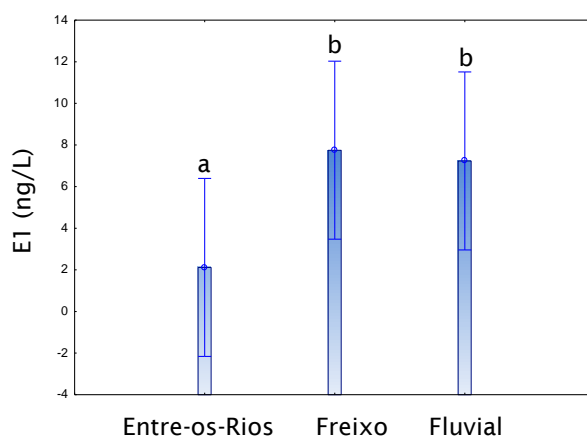


Figura 11. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes locais de colheita (Entre-os-Rios, Freixo e Fluvial). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada local. As diferenças significativas existentes entre locais estão assinaladas com diferentes letras (teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Analisando os dados agrupados pelo mês de colheita observou-se um padrão significativamente mais elevado nas concentrações de E1 no mês de dezembro, em relação aos restantes tempos de amostragem, tal como evidenciado na figura 12.

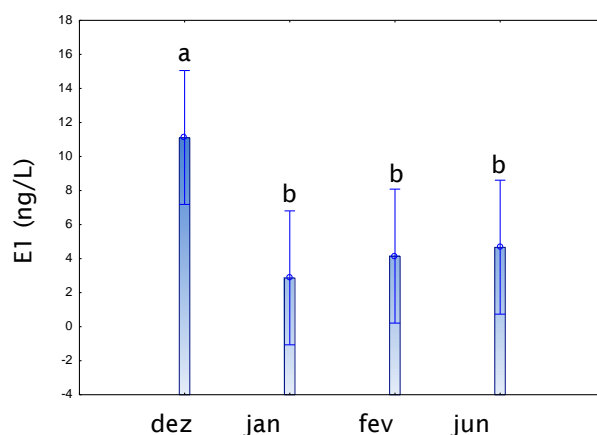


Figura 12. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes meses de colheita (dezembro de 2015, janeiro, fevereiro e junho de 2016). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada mês. As diferenças significativas existentes entre meses estão assinaladas com diferentes letras (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$).

Através da análise da figura 13, é possível constatar que as diferenças obtidas entre as concentrações nos diferentes locais de colheita resultam dos valores mais elevados no mês de dezembro no Freixo.

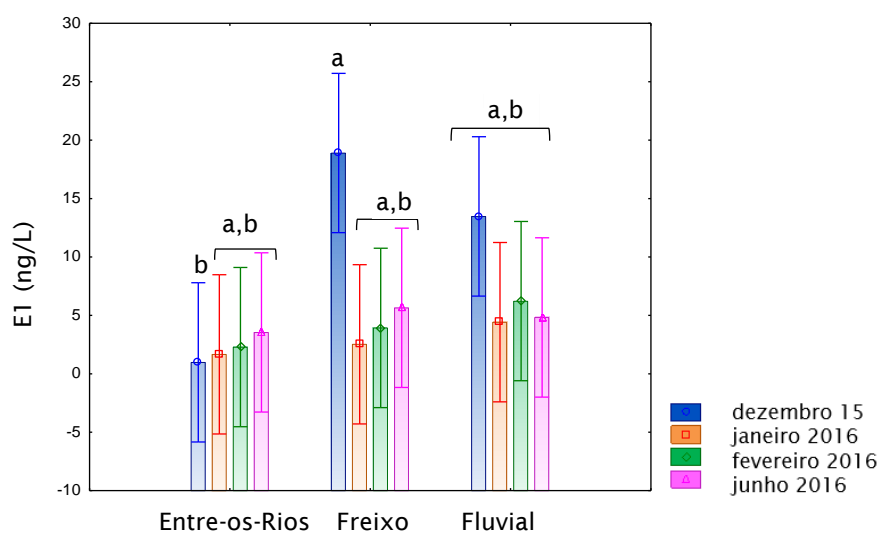


Figura 13. Concentrações (ng/L) de E1 nos diferentes locais (Entre-os-Rios, Freixo e Fluvial) e meses de colheita (dezembro de 2015, janeiro, fevereiro e junho de 2016). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão. As diferenças significativas existentes entre

meses nos vários locais estão assinaladas com diferentes letras (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$).

A variação ao longo do dia das concentrações de E2 não foi significativa (figura 14).

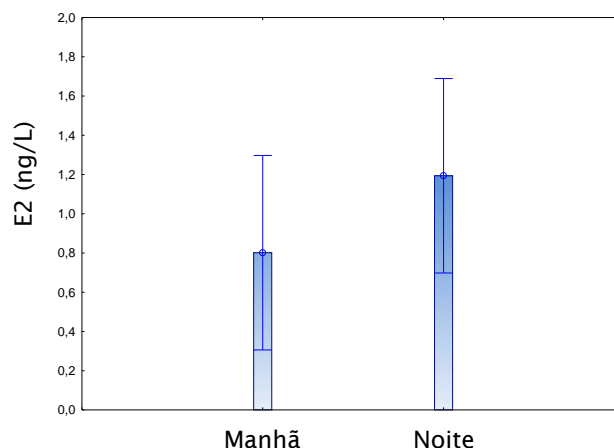


Figura 14. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes períodos de amostragem (manhã e noite). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada período do dia.

No caso do E2 não foram registadas diferenças significativas nas concentrações obtidas nos três locais de colheita, embora no Fluvial a média das concentrações seja cerca de duas vezes superior à encontrada no ponto considerado como referência (Entre-os-Rios) (figura 15).

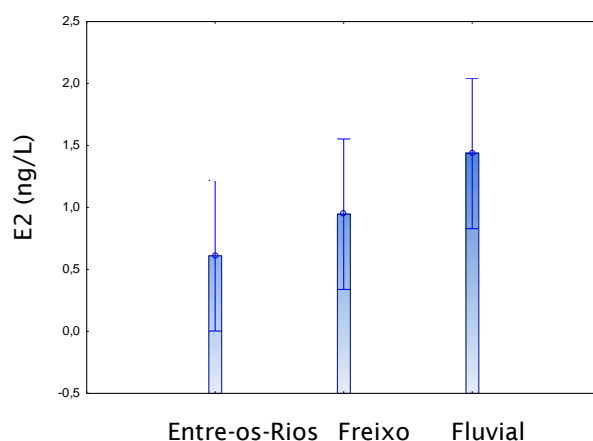


Figura 15. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes locais de colheita (Entre-os-Rios, Freixo e Fluvial). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada local.

Entre os meses de colheita a variação de concentrações de E2 é significativa, observando-se que em dezembro as suas concentrações são mais altas, em específico nos pontos de colheita do Freixo e Fluvial (figura 16 e 17).

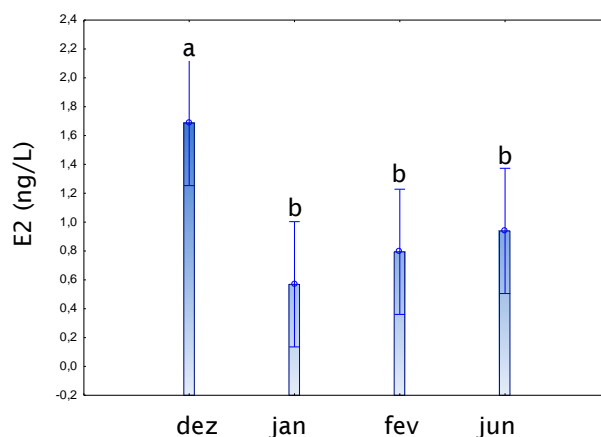


Figura 16. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes meses de colheita (dezembro de 2015, janeiro, fevereiro e junho de 2016). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada mês. As diferenças significativas existentes entre meses estão assinaladas com diferentes letras (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$).

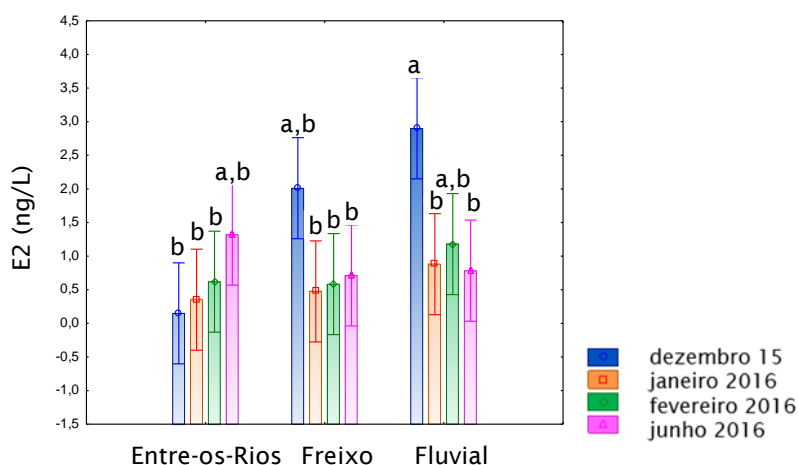


Figura 17. Concentrações (ng/L) de E2 nos diferentes locais (Entre-os-Rios, Freixo e Fluvial) e meses de colheita (dezembro de 2015, janeiro, fevereiro e junho de 2016). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão. As diferenças significativas existentes entre meses nos vários locais estão assinaladas com diferentes letras (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$).

Tal como para a E1 e E2, o EE2 não mostrou diferenças significativas nas suas concentrações ao longo do dia (figura 18).

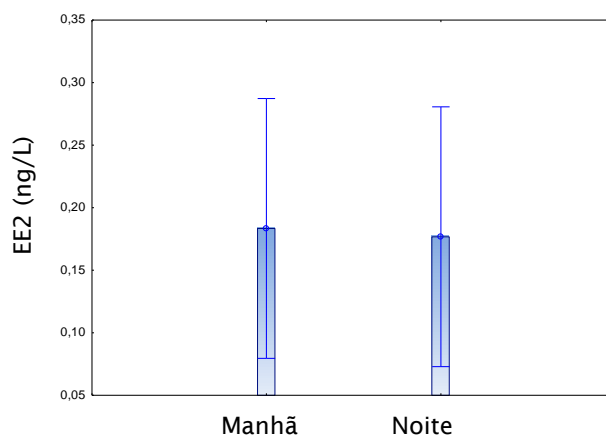


Figura 18. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes períodos de amostragem (manhã e noite). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada período do dia.

Este estrogénio não mostrou igualmente diferenças significativas nas concentrações entre os diferentes locais de colheita (figura 19).

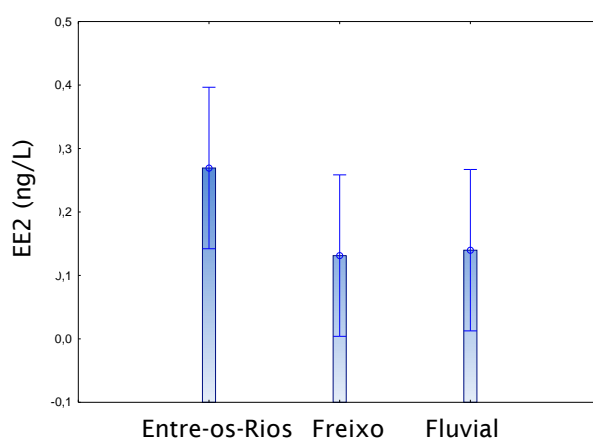


Figura 19. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes locais de colheita (Entre-os-Rios, Freixo e Fluvial). Os valores representados correspondem às médias e respetivo desvio padrão para cada local.

No geral, em relação às diferenças nas concentrações entre os vários períodos de amostragem, o mês de junho apresentou níveis significativamente mais altos, comparativamente com os restantes meses (figura 20), em concreto no local Entre-os-Rios (figura 21).

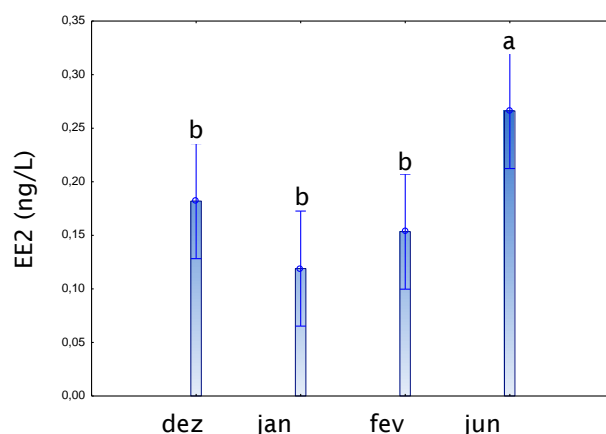


Figura 20. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes meses de colheita (dezembro de 2015, janeiro, fevereiro e junho de 2016). Os valores representados correspondem às médias e respectivo desvio padrão para cada mês. As diferenças significativas existentes entre meses estão assinaladas com diferentes letras (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$).

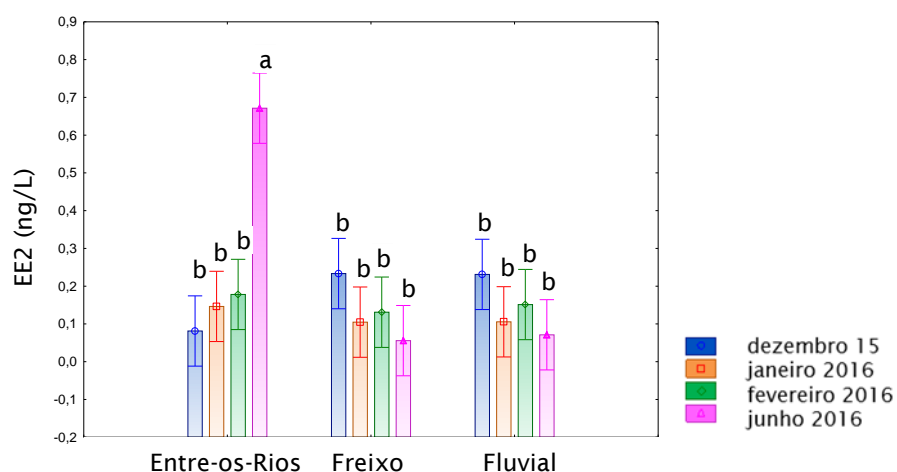


Figura 21. Concentrações (ng/L) de EE2 nos diferentes locais (Entre-os-Rios, Freixo e Fluvial) e meses de colheita (dezembro de 2015, janeiro, fevereiro e junho de 2016). Os valores representados correspondem às médias e respectivo desvio padrão. As diferenças significativas existentes entre meses nos vários locais estão assinaladas com diferentes letras (teste de *Tukey*, $p \leq 0,05$).

Atendendo às concentrações médias das hormonas em cada local de colheita obtiveram-se as potências relativas em equivalentes (Eq) de EE2, tal como demonstrado na tabela 3. No geral, o Fluvial representa o ponto com maior potência estrogénica total, seguido do Freixo e Entre-os-Rios. Em todos os locais o EE2 é a hormona que menos contribui para a potência estrogénica total. Já a E1 apresentou os valores

de potência relativa mais elevados de 1,7 Eq EE2 (ng/L) e 1,9 Eq EE2 (ng/L) no Fluvial e Freixo, respetivamente.

Tabela 3. Potência relativa expressa em equivalentes (Eq) de EE2 (ng/L) para cada uma das hormonas ¹¹⁴.

Local	DEs	Potência relativa face a E2	Concentração média no estuário Rio Douro (ng/L)	Potência relativa Eq EE2 (ng/L)	Potência estrogénica total
Fluvial	EE2	1,3	0,14	0,1	3,03
	E2	1,0	1,44	1,1	
	E1	0,3	7,23	1,7	
Freixo	EE2	1,3	0,13	0,1	2,75
	E2	1,0	0,95	0,8	
	E1	0,3	7,75	1,9	
Entre-os-Rios	EE2	1,3	0,27	0,3	1,24
	E2	1,0	0,58	0,5	
	E1	0,3	2,12	0,5	

4. Discussão

É amplamente reconhecida a importância vital que a água tem para a vida pelo que a sua qualidade tem sido alvo de legislação que visa a sua proteção. Deste modo, surgiu na União Europeia (UE), a DQA que introduziu, em 2000, uma abordagem holística para a gestão e a proteção das águas superficiais e subterrâneas ⁷⁸. A DQA é ainda complementada por acordos internacionais e por legislação em matéria de poluição, qualidade e quantidade da água disponível em cada estado membro da UE.

Portugal, como membro da UE, está sob a regulamentação da DQA tendo-se verificado, principalmente ao longo da última década, um decréscimo das concentrações globais de vários compostos poluentes nas águas superficiais ⁸⁴. De entre a lista de compostos considerados como perigosos ou potencialmente perigosos, desde 2013 que tanto o E2 como o EE2 considerando a sua ação desreguladora endócrina foram assinalados como substâncias a manter sob vigilância ¹¹⁵ e, portanto, alvos a monitorizar regularmente por cada um dos estados europeus.

Compreende-se assim que a utilização de técnicas analíticas capazes de permitir a quantificação de concentrações ambientais cada vez mais baixas (na ordem dos ng/L) tem-se tornado um desafio essencial no desenvolvimento e otimização do processo analítico. Neste sentido, e de modo, a ser possível de forma célere e mais eficaz, monitorizar a variação temporal das concentrações de E1, E2 e EE2 em águas estuarinas optou-se neste estudo por testar, pela primeira vez para as águas do Rio Douro, a aplicabilidade do método de ELISA. Esta técnica, devido à sua elevada sensibilidade aliada à facilidade de utilização e rapidez de execução tinha já sido aplicada em outros trabalhos de cariz ambiental [15-17] e, neste caso mostrou-se totalmente adaptada aos objetivos que orientaram esta Tese.

Neste âmbito, como estudos prévios efetuados neste estuário revelaram a ocorrência de variações da sua composição hídrica derivadas do aumento noturno das descargas dos efluentes de ETARs ¹¹⁶, estabeleceu-se a hipótese de poderem existir flutuações diárias das concentrações de E1, E2 e EE2 nas águas superficiais do estuário do Rio Douro. Como este aspeto nunca tinha sido investigado, procedeu-

se à recolha diária de amostras de água (manhã e noite) tendo sido sempre acau-
telado a sua colheita na maré mais baixa, de modo a evitar diluições aleatórias que
pudessem influenciar os resultados. Os dados revelaram a inexistência de diferen-
ças entre os níveis das hormonas entre colheitas efetuadas no período da manhã
vs. noite. Avança-se assim a possibilidade das ETARs que procedem ao tratamento
dos efluentes urbanos da cidade do Porto, terem aumentado a sua eficiência com-
parativamente à data em o estudo de Azevedo *et al.* (2010) foi realizado. De
acordo, com esta hipótese, a concentração de cada uma das hormonas avaliadas
neste estudo também tem vindo a decrescer quando comparadas com os valores
medidos no passado pelo nosso grupo. Relativamente a este assunto, observou-se
que atualmente as concentrações de E1, E2 e EE2 são em média no estuário do Rio
Douro cerca de 16, 7 e 700 vezes inferiores, respetivamente ¹¹⁷. Realça-se que esses
valores foram em 2006 similares aos encontrados na Catalunha (Espanha) ¹¹⁸.

Os valores atuais, além de bastante baixos permitem ainda confirmar os dados
reportados em 2010 e 2011, ocasião em que os níveis destas hormonas já se situ-
avam em valores aproximados aos de 2016 ^{96, 119}.

Considerando a relação entre as concentrações observadas das hormonas em es-
tudo, verifica-se que aquela que apresenta concentrações mais elevadas é a E1.
Esta observação resulta provavelmente da biodegradação de E2 e EE2 em E1, facto
que ocorre tanto em ETARs como no próprio ambiente, por ação microbiana e fo-
tolítica ¹²⁰. As concentrações médias de E1 foram superiores no Fluvial e Freixo,
comparativamente com o local de referência. Estes encontram-se sob influência de
duas ETARs que servem a grande área metropolitana do Porto, o que corrobora a
hipótese de estar de facto a ocorrer degradação do E2 e EE2 via tratamentos resi-
duais. Acresce que as concentrações de E2 e EE2 foram similares em todos os locais
de amostragem. Assim, embora a potência estrogénica de E1 seja cerca 25% infe-
rior à dos outros estrogénios, o facto de existir em concentrações ambientais mais
altas leva a que esta seja a principal responsável pelos efeitos estrogénicos que
possam vir a ocorrer nas zonas de amostragem. De facto, transformando as con-
centrações de E1 em Eq de EE2, observa-se que tanto no Fluvial como no Freixo
mais de metade da carga estrogénica corresponde à presença de E1. Desde modo,
embora em níveis ambientais baixos, as concentrações de estrogénios medidas
tanto no Fluvial como no Freixo permitem antever a possibilidade de ocorrer des-
regulação endócrina neste habitat ¹²¹. Por exemplo, estudos efetuados em peixe-

zebra (*D. rerio*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) mostram que concentrações de EE2 apenas de 0,1 ng/L e 2 ng/L, respetivamente, conseguem inibir o desenvolvimento testicular ^{122, 123}.

Outro aspeto interessante, e que é reforçado pelos resultados aqui apresentados é o aumento significativo das concentrações de EE2 no mês de junho. Este fenómeno, que também foi reportado em outras zonas costeiras como no Rio Leça ¹²⁴, Rio Lima ¹²⁵, Rio Mira ¹²⁶ e Ria Formosa ¹²⁷ parece indicar uma sazonalidade deste composto que pode estar relacionada com o aumento da atividade turística nas áreas em estudo a partir de junho (início do verão). É, portanto, possível que o aumento inesperado de habitantes na área metropolitana do Porto traga consigo restrições no que diz respeito à capacidade das ETARs tratarem eficazmente uma carga superior de esgotos urbanos. Tal observação não é acompanhada com aumentos significativos de E1 e E2, uma vez que estes estrogénios apresentam maior facilidade de degradação que EE2 ¹²⁰. Por outro lado, a presença de níveis significativamente mais elevados de E1 em dezembro, poderá estar relacionado com um aumento da pluviosidade que ao se ter intensificado neste mês poderá ser responsável pelo arrastamento desta hormona, que também é produto da degradação de E2 e EE2, para os locais de amostragem.

Comparativamente com outros estudos efetuados em zonas costeiras portuguesas, verifica-se que as concentrações E1, E2 e EE2 no estuário do Rio Douro são inferiores aos registados em outras zonas estuarinas tanto a norte como a sul de Portugal ^{39, 114, 124-126, 128}. De facto, de entre todos os estuários estudados somente no Rio Tejo ¹²⁸ foram registadas concentrações de E1, E2 e EE2 inferiores às medidas no Rio Douro. No entanto, olhando para o exterior observa-se que na Europa há já algum tempo os níveis destes estrogénios são semelhantes ou quiçá até inferiores aos registados neste trabalho, e.g. Rio Sena (França) ¹²⁹, águas superficiais alemãs ¹³⁰. Pelo contrário, no Rio Pérola (China), Rio Dan-Shui (Taiwan) e Rio de Tama (Japão) já se encontraram concentrações entre 48 ng/L e 66 ng/L, para a E1, e entre 15 ng/L e 34 ng/L para o E2 ^{50, 131}.

5. Conclusões

Os dados obtidos por ELISA mostram que estrogénios, E1, E2 e EE2, continuam presentes nas águas do estuário do Rio Douro em concentrações semelhantes às observadas em 2010 e 2011. Esta observação permite concluir sobre a aplicabilidade desta técnica analítica para a monitorização temporal de águas superficiais do Rio Douro.

O facto de não existirem diferenças significativas nas concentrações diurnas dos estrogénios em causa, sugere não haver diferenças entre os fluxos noturnos e diurnos, provenientes da descarga das ETARs de Sobreiras e Freixo.

O local escolhido como referência, Entre-os-Rios, diferiu dos outros dois locais de colheita, Fluvial e Freixo apenas nos níveis de E1, que aqui foram menores. A semelhança entre as concentrações de E2 e EE2 nos três locais sugere a intervenção positiva das ETARs (Sobreiras e Freixo) localizadas a montante dos locais considerados como potencialmente mais poluídos por estrogénios.

Em junho notou-se um aumento significativo de EE2 nas águas estuarinas o que poderá estar relacionado com o aumento do número de habitantes da cidade do Porto devido ao aumento do influxo turístico na região.

Finalmente, é de realçar que apesar de baixas, as concentrações de E1, E2 e EE2 como um todo estão acima dos mínimos considerados causadores de desregulação endócrina que continua a ser potencialmente passível de ocorrer nesta área.

6. Referências bibliográficas

1. Bolong N, Ismail A, Salim MR, Matsuura T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*. 239(1), 2009, 229.
2. CAS databases. <https://www.cas.org/>. Acesso em 03.11.2016.
3. Janssen P, Lambert J, Vethaak A, Goos HT. Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus* (L.). *Aquatic Toxicology*. 39(3), 1997, 195.
4. Guillette Jr LJ, Pickford DB, Crain DA, Rooney AA, Percival HF. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *General and Comparative Endocrinology*. 101(1), 1996, 32.
5. Sousa ML, Figueiredo F, Pinheiro C, et al. Morphological and molecular effects of cortisol and ACTH on zebrafish stage I and II follicles. *Reproduction*. 150(5), 2015, 429.
6. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*. 101(5), 1993, 378.
7. Schneider C, Schöler HF, Schneider RJ. Direct sub-ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Analytica Chimica Acta*. 551(1), 2005, 92.
8. Gascón J, Oubiña A, Barceló D. Detection of endocrine-disrupting pesticides by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): application to atrazine. *Trends in Analytical Chemistry*. 16(10), 1997, 554.
9. Colborn T, Dumanoski D, Myers JP. Our Stolen Future: Are we threatening our fertility, intelligence, and survival? A Scientific Detective Story. *New York: Dutton*. 1996, 306 pp. ISBN 0-452-27414-1.
10. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones*. 9(1), 2010, 9.
11. Castro-Correia C, Fontoura M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 10(2), 2015, 186.

12. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 75(5), 2003, 631.
13. Hampl R, Kubátová J, Stárka L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 155 (Part B), 2016, 217.
14. Dickerson SM, Gore AC. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 8(2), 2007, 143.
15. Panzica G, Mura E, Miceli D, Martini M, Gotti S, Viglietti-Panzica C. Effects of xenoestrogens on the differentiation of behaviorally relevant neural circuits in higher vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1163(1), 2009, 271.
16. Kloas W, Urbatzka R, Opitz R, et al. Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1163(1), 2009, 187.
17. Rodgers-Gray TP, Jobling S, Kelly C, et al. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environmental Science and Technology*. 35(3), 2001, 462.
18. Gore A, Wu T, Oung T, Lee J, Woller M. A novel mechanism for endocrine-disrupting effects of polychlorinated biphenyls: Direct Effects on Gonadotropin-Releasing Hormone Neurones. *Journal of Neuroendocrinology*. 14(10), 2002, 814.
19. Kawahara S, Hrai N, Arai M, Tatarazako N. The effect of in vivo co-exposure to estrone and AhR-ligands on estrogenic effect to vitellogenin production and EROD activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 27(1), 2009, 139.
20. Sumpter JP, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*. 103(7), 1995, 173.
21. Schiller V, Wichmann A, Kriehuber R, Schaefer C, Fischer R, Fenske M. Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. *Reproductive Toxicology*. 42, 2013, 210.

22. Chandrasekar G, Arner A, Kitambi SS, Dahlman-Wright K, Lendahl MA. Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*. 33(6), 2011, 752.
23. Kim D-J, Seok S-H, Baek M-W, et al. Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 19(3), 2009, 251.
24. Sassi-Messai S, Gibert Y, Bernard L. The phytoestrogen genistein affects zebrafish development through two different pathways. *PLoS One*. 4(3), 2009, 4935.
25. Ferreira M, Antunes P, Gil O, Vale C, Reis-Henriques M. Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*. 69(4), 2004, 347.
26. Parks L, Lambright C, Orlando E, Guillette L, Ankley G, Gray L. Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicological Sciences*. 62(2), 2001, 257.
27. Aris AZ, Shamsuddin AS, Praveena SM. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*. 69, 2014, 104.
28. Bolton JL, Thatcher GR. Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology*. 21(1), 2007, 93.
29. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*. 30(4), 2009, 293.
30. Hamlin HJ, Guillette LJ. Embryos as targets of endocrine disrupting contaminants in wildlife. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 93(1), 2011, 19.
31. Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine Journal*. 51(2), 2004, 165.
32. Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi JR, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, Kaufman R, Herbst AL, Noller KL, Hyer M. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 15(8), 2006, 1509.

33. Soto AM, Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C. Does breast cancer start in the womb? *Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology*. 102(2), 2008, 125.
34. Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette Jr LJ, Hauser R, Heindel JJ. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology*. 24(2), 2007, 131.
35. Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Altshul L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p, p'-DDE. *Environmental Health Perspectives*. 111(12), 2003, 1505.
36. Dallinga JW, Moonen EJ, Dumoulin JC, Evers JL, Geraedts JP, Kleijnans JC. Decreased human semen quality and organochlorine compounds in blood. *Human Reproduction*. 17(8), 2002, 1973.
37. Toppari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 88(10), 2010, 910.
38. Safe SH. Endocrine disruptors and human health - is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives*. 108(6), 2000, 487.
39. Rocha MJ, Cruzeiro C, Rocha E. Quantification of 17 endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in the Iberian Ave River and its coastline. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 95(3), 2013, 386.
40. Tata JR. One hundred years of hormones. *EMBO reports*. 6(6), 2005, 490.
41. Lin H-Y, Muller YA, Hammond GL. Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 316(1), 2010, 3.
42. Ratman D, Berghe WV, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, Bosscher K. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 380(1), 2013, 41.
43. Belfroid A, Van der Horst A, Vethaak A, Schäfer A, Rijs G, Wegener J, Cofino W. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in

- surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment*. 225(1), 1999, 101.
44. Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology*. 34(24), 2000, 5059.
 45. Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science & Technology*. 35(15), 2001, 3201.
 46. Desbrow C, Routledge E, Brighty G, Sumpter J, Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environmental Science & Technology*. 32(11), 1998, 1549.
 47. Schäfer A, Nghiem L, Waite T. Removal of the natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. *Environmental Science & Technology*. 37(1), 2003, 182.
 48. Bittencourt S, Aisse MM, Serrat BM, Azevedo JCR. Sorption of emerging organic pollutants on wastewater sludge. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*. 21(1), 2016, 43.
 49. Masunaga S, Itazawa T, Furuichi T, et al. Occurrence of estrogenic activity and estrogenic compounds in the Tama river, Japan. *Environmental Science*. 7(2), 2000, 101.
 50. Furuichi T, Kannan K, Giesy JP, Masunaga S. Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and *in vitro* reporter gene assay. *Water Research*. 38(20), 2004, 4491.
 51. Van den Belt K, Berckmans P, Vangenechten C, Verheyen R, Witters H. Comparative study on the *in vitro/in vivo* estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquatic Toxicology*. 66(2), 2004, 183.
 52. Panter G, Thompson R, Sumpter J. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology*. 42(4), 1998, 243.

53. Ryan KJ. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Research*. 42(8), 1982, 3342.
54. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1(1), 2003, 1.
55. De Leo V, Lanzetta D, Morgante G, De Palma P, D'Antona D. Inhibition of ovulation with transdermal estradiol and oral progestogens in perimenopausal women. *Contraception*. 55(4), 1997, 239.
56. Hoffmann H, Moore C, Zimmermann H, Elger W, Schwarz S, Gräser T, Oettel M, et al. Approaches to the replacement of ethinylestradiol by natural 17 β -estradiol in combined oral contraceptives. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 50(4), 1998, 458.
57. Sitruk-Ware R, Nath A. Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. *Best practice and research. Clinical Endocrinology and Metabolism*. 27(1), 2013, 13.
58. Patyna P, Davi R, Parkerton T, Brown R, Cooper K. A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. *Science of the Total Environment*. 233(1), 1999, 211.
59. Picazo O, Becerril-Montes A, Huidobro-Perez D, Garcia-Segura LM. Neuroprotective actions of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol in the hippocampus. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 30(5), 2010, 675.
60. Partridge C, Boettcher A, Jones AG. Short-term exposure to a synthetic estrogen disrupts mating dynamics in a pipefish. *Hormones and Behavior*. 58(5), 2010, 800.
61. Zhang X, Gao Y, Li Q, Li G, Guo Q, Yan C. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 61(1), 2011, 93.
62. Islinger M, Willimski D, Völkl A, Braunbeck T. Effects of 17 α -ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquatic Toxicology*. 62(2), 2003, 85.
63. Christin-Maitre S. History of oral contraceptive drugs and their use worldwide. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 27(1), 2013, 3.

64. Kuster M, de Alda MJL, Barceló D. Estrogens and progestogens in wastewater, sludge, sediments, and soil. *Water Pollution*. 5(0) 2005, 1.
65. Lima DL, Calisto V, Esteves VI. Adsorption behavior of 17 α -ethynylestradiol onto soils followed by fluorescence spectral deconvolution. *Chemosphere*. 84(8), 2011, 1072.
66. Bertin A, Inostroza PA, Quiñones RA. A theoretical estimation of the concentration of steroid estrogens in effluents released from municipal sewage treatment plants into aquatic ecosystems of central-southern Chile. *Science of the Total Environment*. 407(17), 2009, 4965.
67. Gadd JB, Tremblay LA, Northcott GL. Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents. *Environmental Pollution*. 158(3), 2010, 730.
68. Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho S, Hunt P, Iguchi T, Juul A, McLachlan JA, Schwartz J. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertility and Sterility*. 90(4), 2008, 911.
69. Körner O, Kohno S, Schönenberger R, Suter MJF., Knauer K, Guillelte LJ, Burkhardt-Holm P. Water temperature and concomitant waterborne ethinylestradiol exposure affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Aquatic Toxicology*. 90(3), 2008, 188.
70. Pauwels B, Wille K, Noppe H, De Brabander H, Van de Wiele T, Verstraete W, Boon N. 17 α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol. *Biodegradation*. 19(5), 2008, 683.
71. Silva CP, Otero M, Esteves V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. *Environmental Pollution*. 165 (10), 2012, 38.
72. Auriol M, Filali-Meknassi Y, Tyagi RD, Adams CD, Surampalli RY. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*. 41(3), 2006, 525.
73. Sarkar S, Ali S, Rehmann L, Nakhla G, Ray MB. Degradation of estrone in water and wastewater by various advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*. 278, 2014, 16.
74. Zhang Y, Zhou J, Ning B. Photodegradation of estrone and 17 β -estradiol in water. *Water Research*. 41(1), 2007, 19.

75. Bila D, Montalvao AF, Azevedo DdA, Dezotti M. Estrogenic activity removal of 17 β -estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere*. 69(5), 2007, 736.
76. Huber MM, Göbel A, Joss A, et al. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study. *Environmental Science and Technology*. 39(11), 2005, 4290.
77. Zeid NA, Nakhla G, Farooq S, Osei-Twum E. Activated carbon adsorption in oxidizing environments. *Water Research*. 29(2), 1995, 653.
78. DQA. Diretiva 2000/60/CE do parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 2000.
79. Chen C-Y, Wen T-Y, Wang G-S, Cheng H-W, Lin Y-H, Lien G-W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. 378(3), 2007,352.
80. Peng X, Yu Y, Tang C, Tan J, Huang Q, Wang Z. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*. 397(1), 2008, 158.
81. Zhao J-L, Ying G-G, Chen F, Liu Y.-S, Wang L, Yang B, Liu S, Tao R. Estrogenic activity profiles and risks in surface waters and sediments of the Pearl River system in South China assessed by chemical analysis and in vitro bioassay. *Journal of Environmental Monitoring*. 13(4), 2011, 813.
82. Brossa L, Marcé RM, Borrull F, Pocurull E. Occurrence of twenty-six endocrine-disrupting compounds in environmental water samples from Catalonia, Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(2), 2005, 261.
83. Pojana G, Gomiero A, Jonkers N, Marcomini A. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*. 33(7), 2007, 929.
84. Rocha MJ, Rocha E. Estrogenic compounds in estuarine and coastal water environments of the Iberian western atlantic coast and selected locations worldwide—relevancy, trends and challenges in view of the EU water framework directive. *InTech, Toxicology Studies-Cells, Drugs and Environment*. Chapter 7, 2015. 43 pp. DOI: 10.5772/59885.
85. Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T, Estrogenic potency of chemicals detected in sewage

- treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(2), 2001,297.
86. Rocha MJ, Cruzeiro C, Peixoto C, Rocha E. Annual Fluctuations of Endocrine-Disrupting compounds at the lower end of the Lima River, Portugal, and in adjacent coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 67(3), 2014, 389.
 87. Rocha MJ, Cruzeiro C, Rocha E. Quantification of 17 endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in the Iberian Ave River and its coastline. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 95(3), 2013, 386.
 88. Carrola SC, Fontainhas-Fernandes A, Martinho F, Rocha MJ, Ferreira-Cardoso J, Rocha E. Assessment of intersex severity in grey mullets from three Portuguese estuaries - Preliminary data. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular and Integrative Physiology*. 163(1), 2012, 37.
 89. Madureira TV, Rocha MJ, Cass QB, Tiritan ME. Development and optimization of a hplc-dad method for the determination of diverse pharmaceuticals in estuarine surface waters. *Journal of Chromatographic Science*. 48(3), 2010, 176.
 90. Ribeiro C, Tiritan ME, Rocha E, Rocha MJ. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56(1), 2009, 1.
 91. Hibberd A, Maskaoui K, Zhang Z, Zhou J. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. *Talanta*. 77(4), 2009, 1315.
 92. Fayad PB, Prévost M, Sauvé S. On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta*. 115, 2013, 349.
 93. Zhao J-L, Ying G-G, Wang L, Yang JF, Yang XB, Yang LH, Li X. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. 407(2), 2009, 962.
 94. Madureira TV, Barreiro JC, Rocha MJ, Rocha E, Cass QB, Tiritan ME. Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*. 408(22) 2010, 5513.

95. Ribeiro C, Pardal MA, Martinho F, Margalho R, Tiritan ME, Rocha E, Rocha, MJ. Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*. 149(1), 2008, 183.
96. Rocha MJ, Cruzeiro C, Ferreira C, Rocha E. Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal). *Toxicological & Environmental Chemistry*. 94(2), 2012, 252.
97. Berrueta L, Gallo B, Vicente F. A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia*. 40(7-8), 1995, 474.
98. Quirós L, Céspedes R, Lacorte S, et al. Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(2), 2005, 389.
99. Munro C, Laughlin L, VonSchalscha T, Baldwin D, Lasley B. An enzyme immunoassay for serum and urinary levonorgestrel in human and non-human primates. *Contraception*. 54(1), 1996, 43.
100. Fang TY, Praveena SM, deBurbure C, Aris AZ, Ismail SNS, Rasdi I. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review. *Chemosphere*. 165, 2016, 358.
101. Mauricio R, Diniz M, Petrovic M, Amaral L, Peres I, Barceló D, Santana F. A characterization of selected endocrine disruptor compounds in a Portuguese wastewater treatment plant. *Environmental Monitoring and Assessment*. 118(1-3), 2006, 75.
102. Swart N, Pool E. Rapid detection of selected steroid hormones from sewage effluents using an ELISA in the Kuils River water catchment area, South Africa. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 28(4), 2007, 395.
103. Manickum T, John W. The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407(17), 2015, 4949.
104. Hintemann T, Schneider C, Schöler HF, Schneider RJ. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Research*. 40(12), 2006, 2287.
105. Pacáková V, Loukotková L, Bosáková Z, Štulík K. Analysis for estrogens as environmental pollutants-A review. *Journal of Separation Science*. 32(5-6), 2009, 867.

106. Surujlal-Naicker S, Bux F. Application of radio-immunoassays to assess the fate of estrogen EDCs in full scale wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 48(1), 2013, 37.
107. Mispagel C, Allinson G, Allinson M, Shiraishi F, Nishikawa M, Moore M. Observations on the estrogenic activity and concentration of 17 β -estradiol in the discharges of 12 wastewater treatment plants in southern Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56(4), 2009, 631.
108. Nghiem L, Manis A, Soldenhoff K, Schäfer A. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *Journal of Membrane Science*. 242(1), 2004, 37.
109. Vieira ME, Bordalo AA. The Douro estuary (Portugal): a mesotidal salt wedge. *Oceanologica Acta*. 23(5), 2000, 585.
110. Ribeiro AR, Maia A, Santos M, Tiritan ME, Ribeiro CMR. Occurrence of natural contaminants of emerging concern in the Douro River estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 70(2), 2016, 361.
111. Rocha MJ, Cruzeiro C, Rocha E. Development and validation of a GC-MS method for the evaluation of 17 endocrine disruptor compounds, including phytoestrogens and sitosterol, in coastal waters—their spatial and seasonal levels in Porto costal region (Portugal). *Journal of Water and Health*. 11(2), 2013, 281.
112. Hidrográfico I. Previsão de Marés - Leixões. *Instituto Hidrográfico* Available at: <http://www.hidrografico.pt/previsao-mares-leixoes.php>. Accessed during 2015 and 2016.
113. Ribeiro C, Tiritan ME, Rocha E, Rocha MJ. Development and validation of a hplc-dad method for determination of several endocrine disrupting compounds in estuarine water. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 30(18), 2007, 2729.
114. Rocha MJ, Cruzeiro C, Reis M, Pardal MA, Rocha E. Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186(6), 2014, 3337.
115. DQA. Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013 que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. *Jornal Oficial da União Europeia*. 2013.

116. Azevedo IC, Bordalo AA, Duarte PM. Influence of river discharge patterns on the hydrodynamics and potential contaminant dispersion in the Douro estuary (Portugal). *Water Research*. 44(10), 2010, 3133.
117. Ribeiro C, Tiritan ME, Rocha E, Rocha MJ. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River estuary, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 56(1), 2008, 1.
118. Brossa L, Marcé RM, Borrull F, Pocurull E. Occurrence of twenty-six endocrine-disrupting compounds in environmental water samples from Catalonia, Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(2), 2005, 261.
119. Rocha MJ, Ribeiro C, Ribeiro M. Development and optimisation of a GC-MS method for the evaluation of oestrogens and persistent pollutants in river and seawater samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 91(12), 2011, 1191.
120. Yang LH, Cheng Q, Tam NFY, Lin L, Su WQ, Luan TG. Contributions of abiotic and biotic processes to the aerobic removal of phenolic endocrine-disrupting chemicals in a simulated estuarine aquatic environment. *Environmental Science and Technology*. 50(8), 2016, 4324.
121. Mills LJ, Chichester C. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. 343(1-3), 2005, 1.
122. Van den Belt K, Verheyen R, Witters H. Effects of 17 α -ethynylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*): effects on growth, gonads and female reproductive success. *Science of the Total Environment*. 309(1), 2003, 127.
123. Jobling S, Sumpter JP, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15(2), 1996, 194.
124. Rocha MJ, Ribeiro M, Ribeiro C, Couto C, Cruzeiro C, Rocha E. Endocrine disruptors in the Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 94(2), 2012, 262.
125. Rocha M, Cruzeiro C, Peixoto C, Rocha E. Annual fluctuations of endocrine-disrupting compounds at the lower end of the Lima River, Portugal, and in adjacent coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 67(3), 2014, 389.

126. Rocha MJ, Cruzeiro C, Reis M, Pardal MA, Rocha E. Pollution by oestrogenic endocrine disruptors and β -sitosterol in a south-western European river (Mira, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*. 188(4), 2016, 1.
127. Rocha MJ, Cruzeiro C, Reis M, Rocha E, Pardal M. Determination of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in Ria Formosa Lagoon (Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*. 185(10), 2013, 8215.
128. Rocha MJ, Cruzeiro C, Reis M, Pardal MÂ, Rocha E. Toxicological relevance of endocrine disruptors in the Tagus River estuary (Lisbon, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*. 187(8), 2015, 1.
129. Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment* 324, 2004,55.
130. Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC–(NCI)–MS in the picogram per liter range. *Environmental Science and Technology*. 35(15), 2001, 3201.
131. Chen C-Y, Wen T-Y, Wang G-S, Cheng H-W, Lin Y-H, Lien G-W. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. 378(3), 2007, 352.